

---

Hovedoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

# **KARAKTERISERING AV IgG1 OG IgG3 ANTISTOFFER DANNET ETTER VAKSINERING MED MenBvac<sup>TM</sup>**

av

**Marit Øfsdahl**



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

2005

---

## FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Folkehelseinstituttet, Divisjon for smittevern, avdeling for vaksinasjon og immunitet. Veileder har vært professor Terje E. Michaelsen.

Jeg vil først og fremst takke min veileder, Terje E. Michaelsen, for god veiledning og oppfølging gjennom hele perioden.

Videre vil jeg spesielt takke Randi Sandin for uvurderlig hjelp i laboratoriet, mange givende og lærerike diskusjoner og hyggelig samarbeid.

Jeg vil også takke Diane Bryant Bratlie, Tove Herstad og Audun Aase for hjelp og bidrag til gjennomføringen av denne oppgaven.

Til slutt vil jeg takke alle ansatte ved Folkehelseinstituttet som har bidratt til å gjøre dette året både lærerikt og hyggelig.

Oslo, november 2005



Marit Øfsdahl

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORKORTELSER.....</b>	<b>VII</b>
--------------------------	------------

<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>VIII</b>
-------------------------	-------------

<b>1 INNLEDNING .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

1.1 Meningokokker .....	1
-------------------------	---

1.2 Meningokokksykdom .....	2
-----------------------------	---

1.2.1 Behandling av meningokokksykdom.....	4
--	---

1.3 Kroppens beskyttelse mot infeksjon .....	5
--	---

1.3.1 Medfødt immunforsvar .....	5
----------------------------------	---

1.3.2 Ervervet immunforsvar.....	8
----------------------------------	---

1.3.3 Antistoffer.....	14
------------------------	----

1.3.4 Affinitet og aviditet.....	19
----------------------------------	----

1.3.5 Primær- og sekundærrespons .....	19
--	----

1.4 Vaksiner og immunisering.....	20
-----------------------------------	----

1.4.1 Vaksiner mot meningokokker.....	22
---------------------------------------	----

1.5 Hensikt med oppgaven.....	23
-------------------------------	----

<b>2 MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>25</b>
--------------------------------------	-----------

2.1 Vaksinen .....	25
--------------------	----

2.2 Forsøkspersoner, immuniseringsskjema og prøveinnsamling....	25
---	----

2.3 ELISA .....	26
-----------------	----

2.3.1 Kvalitetssikring .....	27
------------------------------	----

2.3.2 Kvantitering av total IgG ved ELISA-metode .....	29
--	----

2.3.3 Kvantitering av IgG1 og IgG3 ved ELISA-metode .....	32
---	----

2.3.4 Måling av aviditet ved ELISA-metode .....	34
---	----

<b>2.4</b>	<b>Kromatografi .....</b>	<b>36</b>
2.4.1	<i>Affinitetskromatografi .....</i>	<i>37</i>
2.4.2	<i>Gelfiltrering.....</i>	<i>39</i>
2.4.3	<i>Ionebytterkromatografi .....</i>	<i>41</i>
<b>3</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Kvalitetssikring .....</b>	<b>45</b>
3.1.1	<i>Positiv kontroll.....</i>	<i>45</i>
3.1.2	<i>Negativ kontroll .....</i>	<i>45</i>
<b>3.2</b>	<b>Kvantitering av IgG antistoffer i serum.....</b>	<b>46</b>
3.2.1	<i>Kvantitering av total IgG.....</i>	<i>46</i>
3.2.2	<i>Kvantitering av IgG1 .....</i>	<i>49</i>
3.2.3	<i>Kvantitering av IgG3 .....</i>	<i>51</i>
<b>3.3</b>	<b>Aviditet av antistoffer i serum og rene fraksjoner .....</b>	<b>53</b>
3.3.1	<i>Aviditet av total IgG i serum .....</i>	<i>54</i>
3.3.2	<i>Aviditet av IgG1 i serum.....</i>	<i>56</i>
3.3.3	<i>Aviditet av IgG3 i serum.....</i>	<i>58</i>
3.3.4	<i>Aviditet av rensset IgG1.....</i>	<i>60</i>
3.3.5	<i>Aviditet av rensset IgG3.....</i>	<i>62</i>
3.3.6	<i>Aviditet av IgG1 og IgG3 før og etter isolering.....</i>	<i>64</i>
<b>3.4</b>	<b>Isolering av antistoffer .....</b>	<b>65</b>
3.4.1	<i>Affinitetskromatografi .....</i>	<i>65</i>
3.4.2	<i>Gelfiltrering.....</i>	<i>67</i>
3.4.3	<i>Ionebytterkromatografi .....</i>	<i>68</i>
<b>4</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Kvalitetssikring .....</b>	<b>70</b>
<b>4.2</b>	<b>Antistoffrespons .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3</b>	<b>Affinitetsmodning .....</b>	<b>72</b>
4.3.1	<i>Aviditet av IgG1 og IgG3 i serum og i rene fraksjoner .....</i>	<i>73</i>

4.4	Kryssreaksjon .....	74
4.5	Isolering av IgG1 og IgG3.....	75
4.6	Statistiske beregninger .....	77
5	KONKLUSJON .....	78
6	LITTERATURLISTE.....	79
7	VEDLEGG .....	86
	Vedlegg 1    Reagenser benyttet til analyser	
	Vedlegg 2    Program for ELISA-vasker (Scanwasher 300)	
	Vedlegg 3    Beregning av antistoffkonsentrasjon	

## FIGURFORTEGNELSE

Figur 1.1	Forekomst av tilfeller av systemisk meningokokk sykdom i Norge .....	3
Figur 1.2	Tilfeller av systemisk meningokokksykdom fordelt på alder .....	3
Figur 1.3	Oversikt over hovedkomponenter og effekt av komplementsystemet.....	8
Figur 1.4	Cytokinproduksjon, effekt og regulering hos CD4-positive lymfocytter .....	11
Figur 1.5	Generell struktur av immunglobulin.....	15
Figur 1.6	Isotyper av immunglobulin .....	15
Figur 1.7	Skjematisk oversikt over strukturen til de 4 IgG subklassene.....	18
Figur 1.8	Primær- og sekundærrespons .....	20
Figur 1.9	Hvordan smittekjeden kan angripes ved vaksinasjon .....	21
Figur 2.1	Oversikt over tidsforløpet for vaksinerings og prøvetaking.....	26
Figur 2.2	Skjematisk fremgangsmåte for indirekte ELISA.....	27
Figur 3.1	Total IgG respons mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	47
Figur 3.2	Total IgG respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	49
Figur 3.3	IgG1 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	50
Figur 3.4	IgG1 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254).....	51
Figur 3.5	IgG3 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	52
Figur 3.6	IgG3 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254).....	53
Figur 3.7	Aviditet av total IgG i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	55
Figur 3.8	Aviditet av total IgG i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	56
Figur 3.9	Aviditet av IgG1 i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	57
Figur 3.10	Aviditet av IgG1 i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	58
Figur 3.11	Aviditet av IgG3 i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	59
Figur 3.12	Aviditet av IgG3 i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	60
Figur 3.13	Aviditet av rensset IgG1 mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	61
Figur 3.14	Aviditet av rensset IgG1 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	62
Figur 3.15	Aviditet av rensset IgG3 mot vaksinstammen (OMV 44/76) .....	63
Figur 3.16	Aviditet av rensset IgG3 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254) .....	64
Figur 3.17	Aviditet før og etter isolering av IgG1 og IgG3.....	65
Figur 3.18	Forurensing av IgG1-fraksjonen .....	67
Figur 4.1	Forholdet mellom total IgG, IgG1 og IgG3.....	71

## TABELLFORTEGNELSE

<b>Tabell 1.1</b>	<b>Former av akutt systemisk meningokokksykdom.....</b>	<b>2</b>
<b>Tabell 1.2</b>	<b>Kommersielt tilgjengelige meningokokkvaksiner i Norge .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabell 2.1</b>	<b>Konsentrasjoner benyttet for standarden for total IgG, IgG1 og IgG3 mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabell 3.1</b>	<b>Resultater fra positiv kontroll.....</b>	<b>45</b>
<b>Tabell 3.2</b>	<b>Resultater fra negativ kontroll.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabell 3.3</b>	<b>Ulike varianter av protein A kromatografi som ble benyttet.....</b>	<b>66</b>

# FORKORTELSER

Ab	Antistoff
Ag	Antigen
ALP	Alkalisk fosfatase
AU	Arbitrære enheter
BSA	Bovint serum albumin
CD	”cluster of differentiation” - differensieringsantigen
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELISA	”enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	”fragment of antigen binding”
Fc	”fragment crystalizable”
FHI	Folkehelseinstituttet
HLA	”human leukocyte antigen” – vevsforlikelighetsantigener
HPLC	”high performance liquid chromatography”
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LC	”liquid chromatography”
LPS	Lipopolysakkarid
MHC	”major histocompatibility complex”
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
NK	”natural killer”
NPP	<i>p</i> -nitrofenylfosfat
OMP	”outer membrane protein” – yttermembranprotein
OMV	”outer membrane vesicle” – yttermembranvesikkel
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	”Polymerase chain reaction”
TCC	Terminalt komplementkompleks
Th	T-hjelper celler



## SAMMENDRAG

Ved Folkehelseinstituttet er det utviklet en vaksine mot gruppe B meningokokker basert på yttermembranvesikler fra stamme 44/76 (MenBvac<sup>TM</sup>). Vaksinen har vist beskyttende egenskaper i en stor klinisk studie. Det har i de siste årene blitt utført mye arbeid for å forstå mekanismene bak den beskyttende effekten av den norske OMV vaksinen mot gruppe B meningokokker.

Vi ønsket å studere utviklingen av IgG1- og IgG3-antistoffer, samt affinitetsmodningen for antistoffene etter en og etter flere doser av vaksinen. IgG1 og IgG3 ble også isolert og undersøkt med hensyn på affinitet for å se om det fantes en kooperasjon mellom subklassene i serum. Kryssreaksjon mot en annen gruppe B meningokokkstamme, NZ 98/265 isolert fra en pasient i New Zealand, ble også studert.

Forsøket besto av 10 friske, frivillige personer som hver fikk 3 doser av vaksinen, hvorav de to siste dosene ble gitt henholdsvis 6 og 46 uker etter første vaksinasjon. Det ble tatt prøver av forsøkspersonene ved hver vaksinasjon samt to uker senere. Total IgG ble kvantitert i alle prøvene. IgG1, IgG3 og aviditet ble bestemt i prøvene tatt 2 uker etter hver vaksinasjon. Kvantitering og aviditet ble bestemt ved hjelp av varianter av ELISA-metoder. Protein A kromatografi ble benyttet for å isolere IgG1 og IgG3.

Dannelsen av IgG1 ble indusert etter 1.vaksine, mens IgG3 først ble indusert etter 2 eller flere doser. Den 3. dosen medførte ingen ytterligere effekt på økningen av antistoffer og de fleste forsøkspersonene oppnådde samme konsentrasjon av antistoff etter denne dosen som de gjorde etter 2. dose.

Det så ut til å foregå en affinitetsmodning av både IgG1 og IgG3 etter vaksinerings. Flere booster-doser så ut til å medføre betraktelig affinitetsmodning for IgG1 og en mer moderat modning for IgG3 mot vaksinstammen (44/76), mens det mot den andre stammen (NZ 98/254) hovedsakelig foregikk en affinitetsmodning for IgG1. Affinitetsmodning foregikk selv om konsentrasjonen av IgG-antistoffer i serum ikke økte.

Antistoffene viste en klar kryssreaksjon med NZ 98/254, men det var likevel tydelig at responsen mot NZ 98/254 var lavere enn mot 44/76. Flere doser av vaksinen resulterte i økt antistoffrespons og affinitetsmodning også mot NZ 98/254.

Det kan se ut som om tilstedeværelse av IgG1 fremmer bindingsstyrken til IgG3 i serum, men det kreves imidlertid flere undersøkelser for å avgjøre om dette er et reelt funn.

# 1 INNLEDNING

## 1.1 Meningokokker

Meningokokker (*Neisseria meningitidis*) ble først beskrevet som årsak til sykdom av Weichselbaum i 1887, men sykdomsbilder med samme etiologi er funnet beskrevet helt tilbake til det 16. århundre [1]. Meningokokkene er gramnegative diplokokker. De er kravstore og krever rikt sammensatte medier og fuktig atmosfære som helst inneholder 5-10 % CO<sub>2</sub> for å vokse [2, 3]. Meningokokkene er meget følsomme for ytre påvirkninger, som for eksempel uttørring og lave temperaturer, og finnes derfor ikke fritt i naturen [3, 4].

Meningokokker kan deles inn i 13 serogrupper (A, B, C, D, E, H, I, K, L, X, Y, Z, W) på basis av antigen spesifisitet av kapselpolysakkaridene [1, 5]. Videre kan de deles inn i et stort antall serotyper og subserotyper [6] på grunnlag av variasjoner i yttermembranproteinene, por A og por B respektivt [1, 7, 8]. De fleste av serogruppene er sjeldent årsak til systemisk sykdom. I Norge og andre europeiske land er serogruppe B og C vanligst [9]. På verdensbasis forårsaker serogruppe A, B og C mer enn 90 % av alle systemiske tilfeller [10, 11].

Mennesket er eneste kjente reservoar for meningokokker [10]. Meningokokker bæres hyppigst i nese og svelg, og finnes i halsen på om lag 10 % av individene i en normal, frisk befolkning. Dette er hovedsakelig gruppe B eller gruppe C meningokokker [4, 10, 12]. Meningokokkstammer som er årsak til systemisk sykdom har polysakkaridkapsel [1]. De aller fleste stammer er akapsulære eller kapsulære stammer som ikke tilhører epidemiske kloner og disse fremkaller dermed ikke sykdom [10]. Av friske bærere er det omtrent 1 % som bærer virulente kloner, og av disse er det kun en liten del som selv blir syke [10, 12]. Ved utbrudd av meningokokksykdom er bærerfrekvensen ofte høyere, spesielt dersom miljøet er tett og lukket. Under et utbrudd av meningokokksykdom på Svalbard på 1970-tallet, ble det funnet en bærerfrekvens på 39 % [13].

Overføring av meningokokker skjer ved dråpesmitte eller ved direkte kontakt [2, 4]. I de fleste tilfellene overføres bakterien fra friske bærere [10]. Mottakeligheten for infeksjon er meget forskjellig og varierer med alder, immunstatus og epidemiologisk situasjon. Bakterien overføres lettere dersom det forekommer andre infeksjoner samtidig. Risikoen for smitte er

også større blant mennesker som bor tett sammen [4]. Sykdom forekommer hyppigst i tørr luft, i perioden januar til mars [1].

## 1.2 Meningokokksykdom

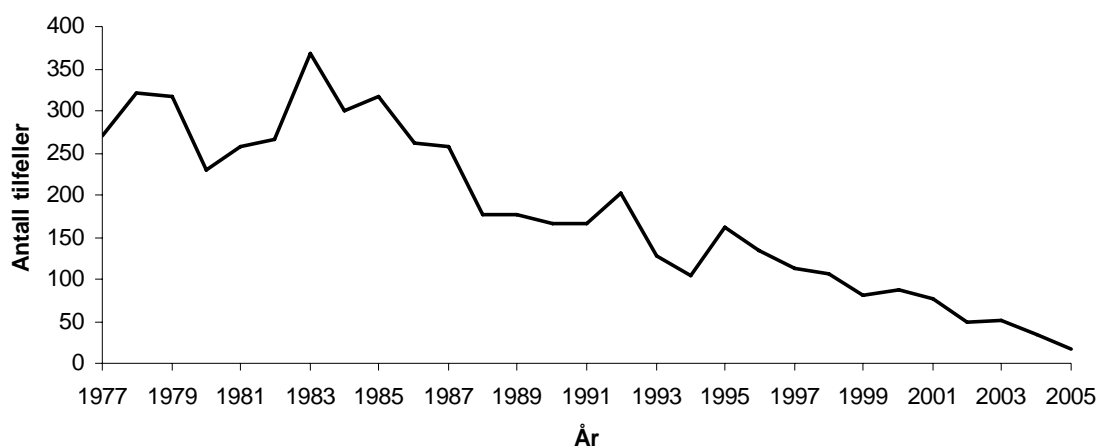
Meningokokker kan medføre både lokalisert og systemisk sykdom og resulterer i mange forskjellige sykdomsbilder. Akutt systemisk meningokokksykdom har størst betydning og kan opptre i flere former [10], vist i tabell 1.1.

**Tabell 1.1    Former av akutt systemisk meningokokksykdom**

Betegnelse	Letalitet	Beskrivelse
Meningitt	2 %	<i>Hjernehinnebetennelse</i>
Septikemi	25 – 60 %	<i>Tilstand med sykdomsfremkallende bakterier i blodet</i>
Meningitt og septikemi	20 – 30 %	–
Annen akutt systemisk meningokokksykdom	lav	<i>Sykdom som ikke har tydelig meningitt eller tilfredsstillende kriteriene for septikemi – kan være tidlige stadier av meningitt eller septikemi</i>

Totalt er dødeligheten for meningokokksykdom omtrent 10 %. Verdens helseorganisasjon har beregnet at det på verdensbasis er omtrent 500 000 tilfeller og 50 000 dødsfall forårsaket av systemisk meningokokksykdom i året [10]. Omtrent 20 % av pasientene får varige mén [10, 14].

Systemisk meningokokksykdommer forekommer oftest spredt i befolkningen. I Norge utgjør enkeltstående tilfeller normalt mer enn 97 % av det totale antall tilfeller [2, 10]. I mindre miljøer kan sykdommen komme i klynger av assosierte tilfeller [10]. Figur 1.1 viser forekomsten av systemisk meningokokksykdom i Norge i perioden 1977-2005.



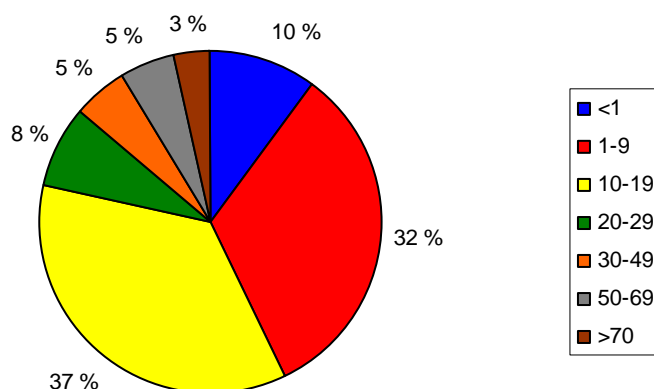
**Figur 1.1 Forekomst av tilfeller av systemisk meningokokk sykdom i Norge**

Figuren viser tilfeller registrert av MSIS fra 1977 til 1. juli 2005

Enkelte grupper er spesielt utsatt for meningokokksykdom [1]:

- Barn under 5 år, spesielt de som er under 1 år og uten maternelle antistoffer (antistoffer overført fra mor under svangerskapet)
- Ungdom mellom 16 og 20 år
- Pasienter med defekter i komplementsystemet
- Personer som har hatt nærkontakt med infiserte individer

De fleste tilfeller av meningokokksykdom i Norge opptrer hos barn under 5 år og hos ungdom mellom 13 og 20 år, henholdsvis omtrent 40 % og 30 % [15]. Figur 1.2 viser tilfeller av systemisk meningokokksykdom i Norge fra 1977-2005 fordelt på aldersgrupper.



**Figur 1.2 Tilfeller av systemisk meningokokksykdom fordelt på alder**

Figuren viser fordelingen av tilfeller blant ulike aldersgrupper i Norge fra 1977 til 1. juli 2005.

Inkubasjonstiden for meningokokksykdom kan være fra 2 til 10 dager, men er vanligvis 3-4 dager [16]. Sjeldne tilfeller med tilsynelatende lengre inkubasjonstid er rapportert [10]. Meningokokksykdom starter ofte med en øvre luftveisinfeksjon. Det første infeksjonsstedet er nasopharynx før meningokokkene eventuelt invaderer cellelagene og når blodbanen [1].

Mikrobiologisk diagnostikk ved systemisk meningokokksykdom bygger i hovedsak på påvisning av meningokokker ved dyrkning av blod og/eller spinalvæske. Identifikasjon av meningokokk-komponenter kan utføres direkte i disse prøvematerialene ved antigenpåvisning eller PCR [1].

Systemisk meningokokksykdom omfattes av meldings- og varslingsplikt til MSIS (Meldingssystem for smittsomme sykdommer) [10]. MSIS er det offisielle norske overvåkingssystemet for smittsomme sykdommer. Kriterier for melding er [10]:

- påvist meningokokker i blod, spinalvæske eller annet vanligvis sterilt vev eller kroppsvæske
- påvist klinisk sykdom forenlig med alvorlig meningokokksykdom med eller uten påvisning av meningokokker i prøve fra luftveier
- påvist klinisk sykdom forenlig med alvorlig meningokokksykdom med påvisning av antistoffer mot meningokokker

### **1.2.1 Behandling av meningokokksykdom**

Meningokokksykdom behandles med antibiotika [10]. På grunn av sykdommens alvorlighetsgrad er det viktig å starte antibiotikabehandling tidligst mulig [4, 17].

Førstevalg for behandling ved meningokokksykdom er benzylpenicillin intravenøst eller intramuskulært [17, 18]. Ømfintligheten for penicillin hos meningokokker er høy, men det er rapportert svakt redusert penicillineffekt på noen stammer i utlandet på grunn av endringer i de penicillinbindende proteiner [1]

Ved et tilfelle av meningokokksykdom vil også utvalgte nærkontakter behandles med penicillin oralt for å forhindre eller mildne flere tilfeller [10, 17].

## **1.3 Kroppens beskyttelse mot infeksjon**

Kroppen beskyttes mot infeksjoner ved hjelp av immunforsvaret. Immunsystemet er avgjørende for menneskets overlevelse [19]. Immunforsvaret kan bekjempe infeksjoner på flere måter og omfatter et stort antall ulike celletyper og en rekke løselige molekyler som deltar i bekjempelsen av fremmede mikroorganismer [19, 20]. Immunforsvaret deles inn i medfødt immunforsvar, også kalt det uspesifikke immunforsvar, og det ervervede immunforsvar, også kalt det spesifikke immunforsvar. Kroppens totale immunforsvar er avhengig av tett samarbeid mellom disse delene [21].

### ***1.3.1 Medfødt immunforsvar***

Medfødt immunitet kan tre i kraft uten at kroppen først har vært i kontakt med den patogene mikroorganismen. Det medfødte immunforsvaret viser ingen spesifisitet for antigener og det mangler immunologisk hukommelse [22, 23]. Til tross for dette er det medfødte immunforsvaret en viktig del av kroppens forsvarsmekanismer. I mange tilfeller vil det medfødte immunforsvaret være i stand til å bekjempe en infeksjon alene. Det medfødte immunforsvaret består av både cellulære og løselige komponenter.

Det første forsvaret mot infeksjoner er mekaniske og kjemiske barrierer som hindrer mikroorganismen i å komme inn i kroppen. Med mekaniske barrierer menes hud og slimhinner som fysisk hindrer adkomsten inn i kroppen og med kjemiske barrierer menes enzymer og sekreter som skilles ut på huden og i slimhinnene [20, 21]. Flere av substansene som skilles ut har antimikrobiell effekt [21]. Hud og slimhinner utgjør stort sett effektive barrierer mot invaderende mikroorganismer [21].

De fleste mikrober må penetrere hud eller slimhinner for å kunne gi infeksjon. Mikrober kan penetrere hud ved traumer, hudsykdommer og kjemisk skade [21].

### **Cellulære komponenter**

De viktigste cellene i det medfødte immunforsvaret er fagocytterende celler og naturlige dreperceller (NK-celler). I tillegg deltar også mastceller og dendritiske celler [20].

### **Fagocytter**

Fagocytter er en samlebetegnelse for makrofager, granulocytter og andre fagocytterende celler. Makrofager utvikler seg fra monocytter og finnes spredt utover i hele kroppen [20]. Makrofager og granulocytter gjenkjenner karakteristiske egenskaper ved en rekke mikroorgansimer og fagocytterer disse. Fagocytose er en prosess hvor mikrobene tas opp i fagocytten og deretter brytes ned [24]. Granulocytter skiller seg fra makrofagene ved at de inneholder vesikler, granula, som er fylt med ulike proteolytiske enzymer og en rekke forbindelser med sterk antimikrobiell effekt [20]. Normalt finnes granulocytterne sirkulerende i blodbanen, men de forflytter seg raskt til betennelsesstedet dersom det oppstår en infeksjon ved at de tiltrekkes til forbindelser som dannes på betennelsesstedet [20, 22].

### **NK-celler**

NK-cellenes hovedfunksjon er knyttet til bekjempelsen av virussykdommer gjennom å kunne identifisere og drepe de av kroppens celler som er infisert med virus. NK-celler gjenkjenner målet på en av to måter:

1. NK-cellene har reseptorer som gjenkjenner Fc-delen av antistoffer. Dersom en virusinfisert celle har bundet antistoff kan NK-cellen identifisere den som en infisert celle for deretter å drepe cellen, enten ved å frigjøre cytotoksiske substanser (perforiner og granzymmer) eller ved å ødelegge cellemembranen [20].
2. NK-cellene er utstyrt med membranreseptorer som hemmer aggresjon overfor kroppens egne celler. Alle kroppens celler har vevsforlikelighetsantigener (HLA-molekyler), og disse gjenkjennes av membranreseptorene som kroppsegne. Dersom en virus infeksjon fører til nedgang i HLA-molekylene på cellemembranen vil NK-cellene kunne angripe og drepe cellene [20, 22].

### **Løselige komponenter**

Komplementsystemet er de viktigste løselige komponentene i det medfødte immunforsvaret. I tillegg finnes akutt-faseproteiner og interferoner av  $\alpha$ - og  $\beta$ -type som bidrar på ulike måter til immunresponsen.

### **Komplementsystemet**

Komplement spiller en viktig rolle i immunforsvaret mot meningokokksykdom. Komplementsystemet er et kaskadesystem av enzymatiske proteiner som aktiverer hverandre i



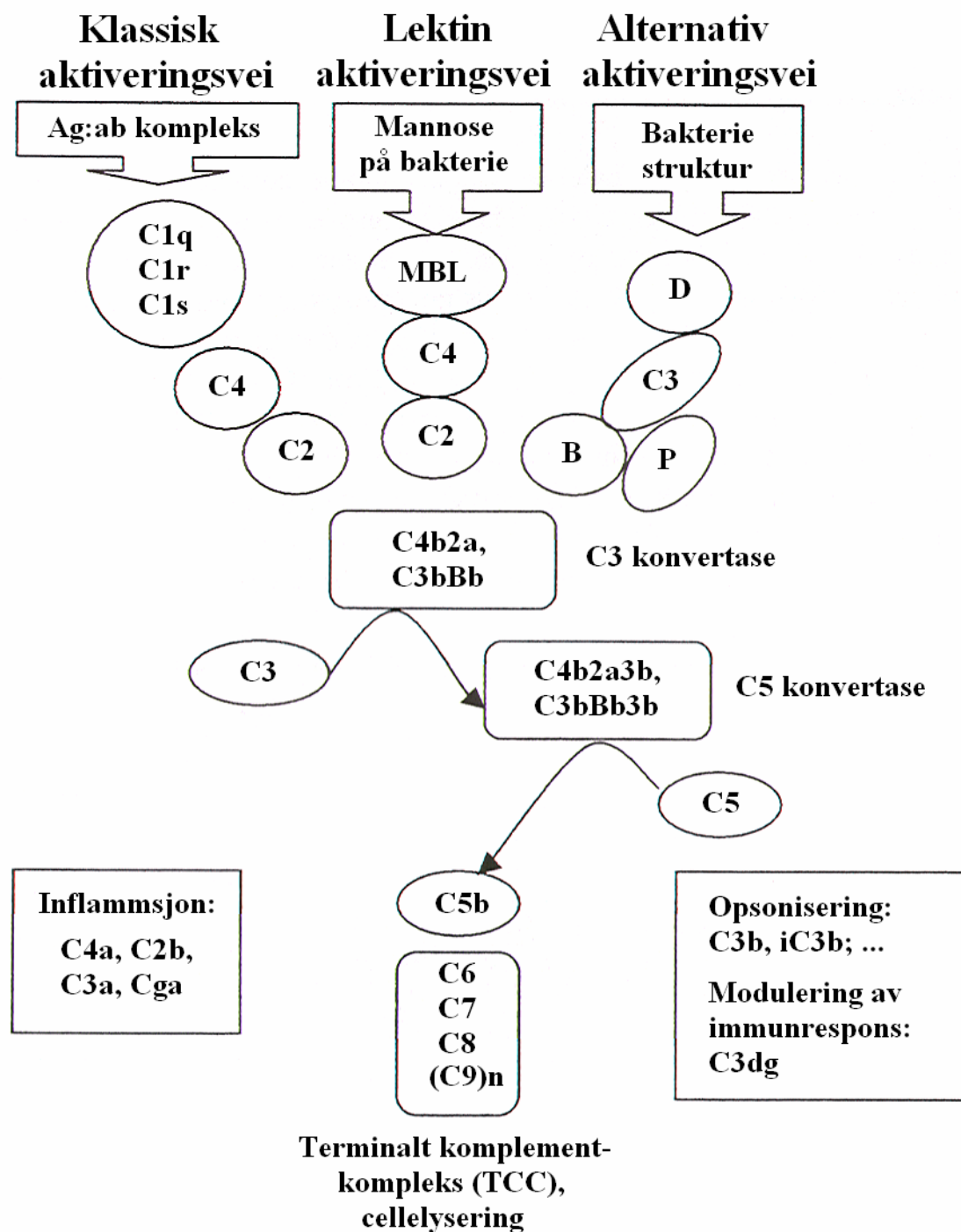
en kjedereaksjon. Komplementsystemet består av over 20 ulike plasmaproteiner og vanligvis sirkulerer disse i blodet som inaktive forstadier [23, 25].

Komplementsystemet kan aktiveres på tre forskjellige måter; klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei og lektin aktiveringsvei. Det er kun den alternative- og lektin aktiveringveien som er en del av det medfødte immunforsvaret. Alternativ aktivering settes i gang av bestemte strukturer på mikrobeoverflaten (for eksempel LPS) [20] og lektin aktivering via plasmalektin som bindes til mannose på bakterieoverflaten [26]. Disse aktiveringsmekanismene kan inntre umiddelbart etter en infeksjon fordi mange bakterier og virus har disse overflateegenskapene [20, 22]. Klassisk aktiveringsvei krever i de fleste tilfeller at det er dannet antistoffer mot den aktuelle mikroorgansimen på forhånd og hører derfor til under ervervet immunitet [20].

Aktivering av komplementsystemet fører til dannelse av produkter som virker hovedsaklig på fire forskjellige måter [20]:

1. bidrar til den inflammatoriske prosessen ved å fremme frigjøring av en rekke farmakologisk aktive forbindelser
2. effektiviserer fagocytosen ved å merke patogener ved å feste seg til cellemembranen og celleveggen (opsonisering)
3. fører til lysering av patogener og celler ved at det terminale komplementkomplekset bindes til biologiske membraner og lager transmembrane porer
4. stimulerer til økt antistoffproduksjon

Dannelse av TCC er meget viktig for eliminering av meningokokker [27]. Dette komplekset interagerer med cellemembranen på målcellen og induserer lysering. Grampositive bakterier har imidlertid egenskaper som hindrer TCC i å nå den indre plasmamembranen og dermed hindrer lysering av bakterien [28]. Gram negative bakterier, som meningokokker, mangler denne beskyttende egenskapen og TCC vil medføre lysering av cellen [29, 30].



**Figur 1.3** Oversikt over hovedkomponenter og effekt av komplementsystemet

Gjengitt med tillatelse fra Audun Aase

### 1.3.2 Ervervet immunforsvar

Den ervervede delen av immunforsvaret er knyttet til lymfocyttenes funksjoner [21, 23]. I motsetning til det medfødte immunforsvaret viser det ervervede immunforsvaret spesifisitet for antigener samt immunologisk hukommelse [20, 21]. Blant alle cellene i kroppen er det

kun lymfocytene som er i stand til å spesifikt gjenkjenne fremmed materiale og skille dette fra kroppens eget [20]. Lymfocytene har spesifisitet i det en gitt lymfocytt bare vil reagere med et bestemt antigen. En regner med at det finnes lymfocytter med minst  $10^9$  forskjellige antigene spesifisiteter [21]. Det ervervede immunforsvaret er karakterisert ved en latensfase. Det tar altså 4 til 7 dager før mekanismene i det ervervede immunforsvaret trer i kraft [21].

Lymfocytene stammer fra felles, uspesialiserte celler (stamceller) i beinmargen. De videreutvikles og modnes i primært lymfoid vev (benmarg og thymus). Lymfocytene som modnes i beinmargen, kalles B-lymfocytter, mens de som modnes i thymus, kalles T-lymfocytter [21, 23]. Før lymfocytene kan utføre sine oppgaver i immunforsvaret må de gjennom en afferent fase der de møter og blir stimulert av antigen og en fase der de utvalgte, antigenstimulerende cellene deler seg i det som kalles en klon ekspansjon [21].

Alle kjerneholdige celler produserer proteiner fortløpende. Proteolytiske fragmenter av de proteiner cellen syntetiserer, presenteres hele tiden på cellens overflate bundet til vevsforlikelighetsantigener (MHC-molekyler). I løpet av fosterlivet utvikles immunologisk toleranse for de peptidfragmentene som inngår i normale, kroppsproduserte proteiner. Hvis cellene på et senere tidspunkt presenterer avvikende sekvenser blir cellene blinket ut av immunsystemet og drept. Immunsystemet kontrollerer med andre ord hele tiden, ved hjelp av MHC-proteinene, om kroppens celler fungerer normalt, det vil si om de produserer ”normale” proteiner [23]. Det finnes to hovedgrupper av MHC-molekyler [23]:

- MHC klasse I
- MHC klasse II

Med unntak av røde blodlegemer, trombocytter og nerveceller finnes MHC-proteiner av klasse I på overflaten av alle kroppens celler, mens MHC klasse II bare finnes på overflaten til de profesjonelle antigenpresenterende cellene (makrofager, B-lymfocytter og dendrittske celler) [23] og aktiverte T-lymfocytter [31].

De profesjonelle antigenpresenterende cellene har evnen til å ta opp bestanddeler av mikroorganismer, behandle dette materialet intracellulært og presentere peptidfragmenter bundet til MHC klasse II-molekyler. Det er særlig peptidantigener som er produsert intracellulært, for eksempel virusproteiner, som presenteres på overflaten sammen med MHC

klasse I-molekyler [21]. En individuell lymfocyt som selektivt gjenkjenner ”sitt” antigen responderer ved å prolifere til en klon av lymfocytter med identisk spesifisitet for samme antigen [25].

## **T-lymfocytter**

For å aktivere den cellulære immunresponsen ved infeksjonssykdommer må antigener fra mikroorganismen presenteres for spesifikke T-lymfocytter i lymfoid vev. T-lymfocytterne gjenkjenner ikke fritt antigen [20, 21]. Peptidantigener må presenteres sammen med vevsforlikelighetsantigen (MHC) av klasse I eller klasse II [21].

T-lymfocytterne kan deles inn etter forekomsten av membranmolekyler på overflaten. Disse membranmolekylene kalles differensieringsantigener som forkortes CD (Cluster of Differentiation) [20]. Differensieringsantigener finnes også på andre celletyper, men i denne oppgaven omtales de kun i forbindelse med T-lymfocytterne da differensieringsantigenene er avgjørende for klassifiseringen av disse.

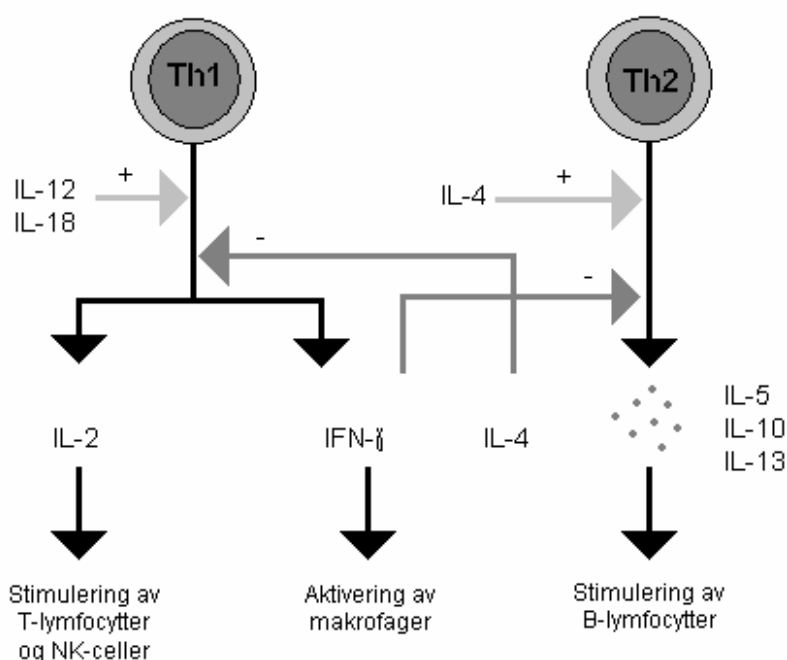
### ***CD4-positive T-lymfocytter***

Komplekset av antigen og MHC klasse II gjenkjennes av CD4-positive T-lymfocytter som har den riktige antigene spesifisiteten. CD4-positive T-lymfocytter kalles også T-hjelpeceller (Th-celler) [21]. Interaksjonene mellom den antigenpresenterende cellen og T-lymfocytten fører til aktivering av T-lymfocytten som begynner å produsere cytokiner. Antigenstimulerte T-lymfocytter begynner å prolifere og det dannes en ekspanderende celleklon med samme antigene spesifisitet. Når de nydannede T-lymfocytterne presenteres for det samme antigenet, vil de også bli aktivert og produsere cytokiner [21]. Til enhver tid sirkulerer T-lymfocytterne mellom lymfoid vev og blodbanen. Dette sikrer at T-lymfocytterne oppdager antigener som presenteres i det lymfoide vev [21].

CD4-positive T-lymfocytter er de viktigste regulatorcellene i immunsystemet. De produserer et stort antall cytokiner som griper inn i en rekke sider i immunreaksjonen [23]:

- Cytokiner nødvendig for deling og differensiering av B-lymfocytter og T-lymfocytter som har bundet antigen
- Cytokiner som gjør at makrofagene får mye større kapasitet til å fagocyttere

CD4-positive T-lymfocytter kan deles inn i Th1- og Th2-lymfocytter basert på hver sin karakteristiske cytokinproduksjon. En del T-lymfocytter er mindre spesialisert i sin cytokinproduksjon. De kalles ofte Th0-lymfocytter.



**Figur 1.4 Cytokinproduksjon, effekt og regulering hos CD4-positive lymfocytter**

*Fra Medisinsk mikrobiologi av Degré et al. [32]*

Produksjonen av cytokiner som modulerer den samlede immunrespons er de CD4-positive T-lymfocyttenes viktigste effektorfunksjon. Uten at CD4-positive T-lymfocytter deltar, fungerer derfor verken det antistoffavhengige eller det cellulære immunforsvaret tilfredsstillende.

### **CD8-positive T-lymfocytter**

CD8-positive T-lymfocytter, også kalt cytotoksiske lymfocytter, gjenkjenner peptidantigen presentert av MHC klasse I. Alle kjerneholdige celler kan dermed fungere som antigenpresenterende celler for cytotoksiske T-celler [23]. Det trengs to signaler for at de CD8-positive lymfocytterne skal begynne å proliferere. Lymfocytten må gjenkjenne komplekset av antigen og MCH klasse I i tillegg til at cellen må stimuleres av cytokiner fra aktiverte CD4-positive lymfocytter [21].

En cytotoksisk T-celle kan både gjenkjenne og uskadeliggjøre den fremmede cellen. CD8-positive lymfocytter har som hovedoppgave å drepe målceller som uttrykker det aktuelle antigen sammen med MHC klasse I på overflaten. Denne celletypen må komme i direkte kontakt med cellen som skal ødelegges [23]. Disse cytotoksiske T-lymfocytterne binder seg midlertidig til målcellen og dreper den. Den viktigste drapsmekanismen er induksjon av apoptose hos målcellen. I tillegg utskiller T-lymfocytten perforin som fører til membranskade hos målcellen [21]. Den cytotoksiske T-cellen skades ikke i prosessen og kan vandre videre og dermed drepe flere virusinfiserte celler [23].

## **B-lymfocytter**

Etter utvikling i benmargen, migrerer B-lymfocytterne til blod og lymfoid vev. B-lymfocyttenes antigenreseptor er en membranbundet variant av antistoffmolekyler [20, 21, 23]. Et antistoffmolekyl kan bare gjenkjenne en antigenepitop [23]. Når en B-lymfocyt med den rette spesifisiteten møter sitt antigen i lymfoid vev, vil antigenet bindes [21]. Membranreseptorene kan binde antigen både når det er fritt i ekstracellulærvæsken og når det er en del av en celle [23].

Binding av antigen kan forårsake en stimulering av cellene slik at de gjennomgår en ny utviklingsprosess. Denne prosessen omfatter flere runder med celledeling, samtidig som det skjer en ytterligere differensiering [20]. Under utviklingsprosessen foregår også en seleksjonsprosess der B-lymfocytter som binder antigen med høy affinitet overlever, mens de med lav affinitet induseres til apoptose. Denne prosessen kalles affinitetsmodning. Derved prefereres produksjonen av antistoffer med høy affinitet overfor antigenet. B-lymfocytter som overlever seleksjonsprosessen kan deretter utvikle seg videre enten til plasmaceller eller til hukommelses-B-lymfocytter [21].

Det skilles mellom thymus-avhengige antigener som er proteiner og thymus-uavhengige antigener som vanligvis er karbohydrater eller lipider. Binding av et thymus-avhengig antigen til en B-lymfocyt fører til forandringer i cellen. Cellen blir aktivert og den vil ta opp, behandle og presentere proteinantigenet i form av peptid sammen med MHC klasse II-molekyl på celleoverflaten. Derved aktiveres CD4-positive T-lymfocytter med riktig spesifisitet. Disse T-lymfocytterne bidrar så med hjelp til deling og modning av B-lymfocytterne via blant annet cytokinproduksjon som nevnt overfor.

Thymus-uavhengige antigener synes å kunne indusere antistoffproduksjon uten hjelp fra T-lymfocytter. Antistoffresponser overfor thymus-uavhengige antigener består i overveiende grad av antistoffer med lav affinitet. Det induseres ikke affinitetsmodning eller dannelsen av hukommelses-B-lymfocytter. På den annen side induseres den thymus-uavhengige responsen raskere enn den thymus-avhengige responsen fordi den ikke, eller i liten grad, er avhengig av T-lymfocytaktivering [21].

### ***Plasmaceller***

Plasmacellene har mer cytoplasma og er større enn B-cellene. Disse er effektorceller [20]. Plasmacellene produserer og skiller ut antistoffer som er identiske med reseptorene på B-cellene som gjenkjente og bandt antigenepitopen. Antistoffmolekylene som produseres av plasmacellene er ikke festet til cellemembranen, men skilles ut fra cellen. Når frie, sirkulerende antistoffmolekyler treffer det riktige antigenet, bindes antigenet. Dette utløser reaksjoner som gjør at antigenet uskadeliggjøres [23].

Antistoffene er proteiner, og for de fleste av plasmacellene er proteinproduksjonen så ensidig rettet mot antistoffproduksjon at det dannes for lite proteiner for cellenes eget behov. Disse plasmacellene dør derfor etter noen få dager med intens antistoffproduksjon [33, 34]. Det dannes imidlertid også langlivede plasmaceller. Det er hovedsakelig plasmaceller som produserer høy-affinitetsantistoffer som utvikles til langlivede plasmaceller [35, 36]. Disse lever i beinmargen og sekreterer antistoff kontinuerlig og opprettholder dermed ett visst nivå av spesifikke antistoffer i serum. Produksjonen av antistoffer fra plasmaceller er uavhengig av tilstedeværelse av antigen [37, 38]. Det har vært anslått at en enkelt plasmacelle er i stand til å produsere om lag 2000 antistoffmolekyler per sekund [39, 40]. Ved aktiveringen av B-lymfocytter differensieres de fleste cellene til plasmaceller [23].

### ***Hukommelses-B-lymfocytter***

B-lymfocytene som ikke differensieres til plasmaceller etter aktivering kan differensieres til hukommelsesceller. Hukommelsescellene deltar ikke i den umiddelbare bekjempelsen av antigenet, men fortsetter å leve videre i mange måneder og år etter at antigenet er eliminert. Disse gjør at immunresponsen vil komme raskere i gang dersom kroppen utsettes for det samme antigenet ved en senere anledning [20, 23]. Kroppens mekanismer for å opprettholde nivået av hukommelses-B-lymfocytter gjennom livet er fortsatt lite kjent [41].

### 1.3.3 Antistoffer

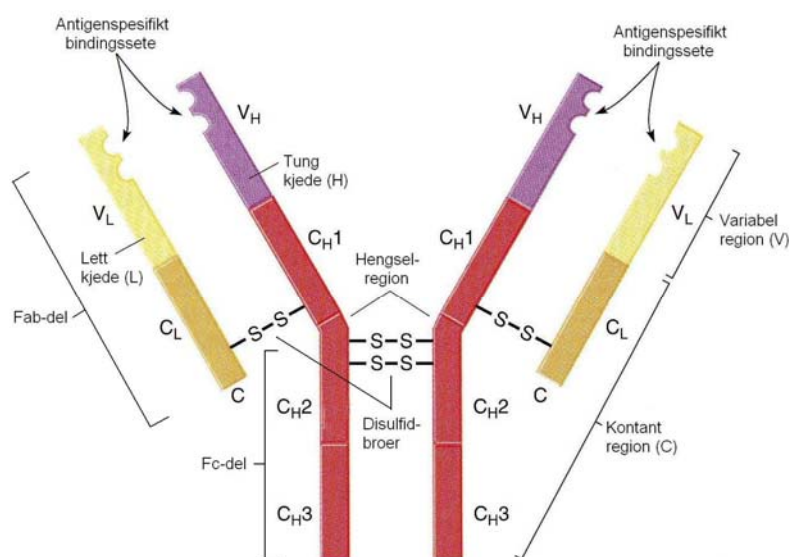
Antistoffer ser ut til å spille en stor rolle i beskyttelsen mot meningokokksykdom. Antistoffer, eller immunglobuliner som de også kalles, er store, globulære glykoproteiner. Som tidligere nevnt finnes antistoffer i bundet form som reseptorer på overflatene av B-lymfocytter, eller som løselige effektormolekyler fritt sirkulerende i blodet [20].

Generell struktur for et antistoff er vist i figur 1.5. Antistoffene er bygget opp av to identiske lette og to identiske tunge polypeptidkjeder som stabiliseres og bindes sammen av hydrofobe interaksjoner og disulfidbroer [42, 43]. Til sammen danner dette en Y-formet struktur. Alle kjedene har en variabel del og en konstant del. Den variable regionen,  $V_H$ , og den konstante regionen,  $C_H1$ , på den tunge kjeden sammen med de korresponderende regionene på den lette kjeden,  $V_L$  og  $C_L$ , utgjør Fab-delen av molekylet. Resten av de tunge kjedene utgjør Fc-delen. De variable regionene inneholder stedet som binder antigen. Forskjellene i aminosyresekvensen i de variable regionene sørger for stor variasjon av bindingssteder som er spesifikke for ulike antigener [19]. Antall ulike spesifisiteter hos mennesket er anslått til mellom  $10^9$  og  $10^{10}$  [21]. Hengselregionen består av en eller flere disulfidbroer som binder de to tunge kjedene sammen [44]. Hengselregionen kobler sammen Fab- og Fc-delen av antistoffet og har avgjørende betydning for antistoffets funksjonelle og strukturelle egenskaper. Fc-delen er avgjørende for mesteparten av effektorfunksjoner forbundet med immunglobuliner og det er også denne delen av molekylet som avgjør hvilken klasse immunglobulinet er [20]. Fc-delens effektorfunksjoner inkluderer aktivering av komplement og interaksjoner med effektorceller. Fc-delen er også viktig for immunglobulinets halveringstid [45].

Antistoffenes viktigste funksjoner i immunresponsen er å [20]:

- Nøytralisere mikroorganismen og eventuelle toksiner
- Fremme fagocytosen ved å fungere som opsoniner
- Aktivere komplement via klassisk aktiveringsvei



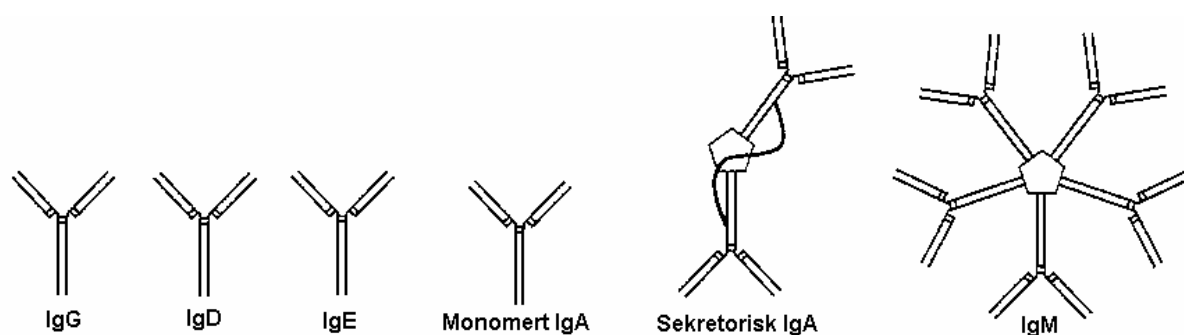


**Figur 1.5 Generell struktur av immunglobulin**

Tilpasset fra <http://homepage.usask.ca/~kmj127/antibody.jpg>

## Isotyper

Ut fra strukturen av de tunge kjedenes konstante del kan antistoffene deles inn i fem klasser eller isotyper. Hver av isotypene har ulik biologisk effekt og isotypen er avgjørende for en rekke funksjonelle egenskaper, blant annet evnen til komplementaktivering, binding til reseptorer og motstandsevne til proteolytisk nedbrytning. De ulike isotypene er IgA, IgD, IgE, IgG og IgM som vist på figur 1.6 [20, 21, 23, 25].



**Figur 1.6 Isotyper av immunglobulin**

Tilpasset fra *Medisinsk mikrobiologi* av Degré et al. [32]

En aktivert B-lymfocyt danner bare antistoffer med identisk spesifisitet. B-lymfocytten kan imidlertid endre antistoffets klasse over tid. Siden de forskjellige isotypene har funksjonelt ulike egenskaper, kan immunsystemet ved denne mekanismen tilpasse immunresponsen mot et bestemt antigen [21].

***IgA***

IgA utgjør omtrent 15 % av den totale mengde immunglobulin i kroppen [22]. Dette immunglobulinet er det viktigste i kroppens sekreter som spytt, tårevæske, svette og morsmelk [46]. Noe IgA finnes i serum som et monomert immunglobulin, men mesteparten av IgA finnes i sekretene som polymeriserte dimere [22]. I den dimere formen stabiliseres strukturen av sekretkomponent. Sekretkomponent produseres av slimhinnes epitel og er viktig for transport av IgA-molekyler gjennom epitellaget [20, 21]. På grunn av sin struktur er sekretorisk IgA motstandsdyktig mot proteolytisk nedbrytning av enzymer i sekretene. IgA finnes på kroppens slimhinner og anses for å være en viktig komponent i første forsvarslinje mot invaderende mikroorganismer [47].

***IgD***

IgD finnes i serum i lave konsentrasjoner og utgjør mindre enn 0,5 % av den totale mengden immunglobulin. IgD uttrykkes sammen med IgM på overflaten til B-celler og mer enn 90 % av B-cellene er IgD+/IgM+ celler [48]. Det faktum at IgD finnes hos alle pattedyr samt eksistens av reseptor for IgDs Fc-del tyder på at IgD bør ha en distinkt funksjon [49], men det er fortsatt ikke påvist spesielle funksjoner for denne typen av immunglobulin [20, 22].

***IgE***

IgE finnes også i serum i svært lave konsentrasjoner. Hovedfunksjonen til IgE er å binde via Fc-delen til overflaten av mastceller og granulocytter og utstyre disse med antigenreseptorer. Disse celletypene har reseptorer for IgE i plasmamembranen. Dersom IgE-molekyler på overflaten av de nevnte cellene kryssbindes eller aggregeres, for eksempel ved binding av antigen, kan dette føre til aktivering av cellene etterfulgt av frigjøring av flere ulike substanser. Disse substansene fremmer betennelsesprosessen som er en del av første forsvarslinje og kan være toksiske for en del mikroorganismer [50, 51]. IgE kan også utløse allergiske reaksjoner [20-22].

***IgG***

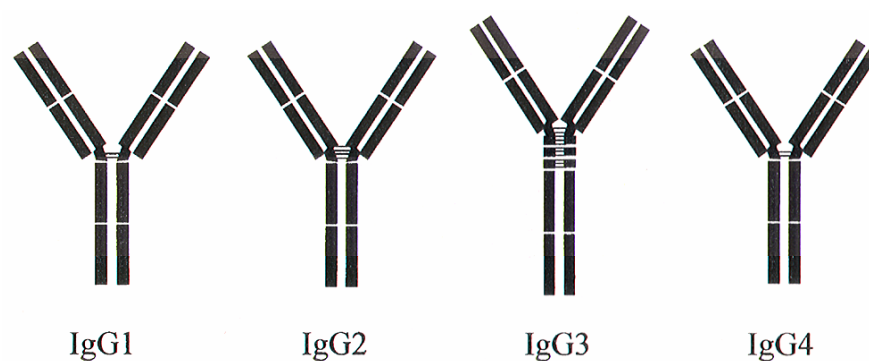
IgG er det viktigste antistoffet i beskyttelsen mot meningokokker og i immunresponsen generelt. IgG er det dominerende immunglobulinet i serum og utgjør 80 % av total mengde immunglobulin i kroppen. IgG-antistoffene har gjerne høy affinitet [21]. IgG finnes i både serum og i vevsvæsker [22].

Immunoglobuliner av IgG type virker mot bakterier og virus ved å opsonisere fremmede mikroorganismer og nøytralisere toksiner [22]. IgG er det eneste immunoglobulinet som kan krysse placenta. Antistoffene som krysser placenta gir naturlig immunitet til det nyfødte barnet og er spesielt viktig for barnets infeksjonsforsvar de første levemånedene. Etter fødselen brytes disse antistoffene gradvis ned [20-22]. IgGs viktigste biologiske funksjoner i immunsystemet er blant annet aktivering av komplement og indusering av fagocytose.

IgG-antistoffer kan aktivere komplement via den klassiske aktiveringsvei. Aktivering av komplement fører, som tidligere nevnt, til dannelse av TCC som er meget viktig for lysing og dermed eliminering av meningokokker [29, 30].

Fagocytose ser ut til å spille en viktig rolle i beskyttelsen mot meningokokksykdom [52]. Fagocytose er tidligere beskrevet under medfødt immunrespons og omfatter da direkte binding av målcelle (mikrobe) til fagocyt etterfulgt av nedbryting av mikroben. Imidlertid er det mange mikroorganismer, inkludert meningokokker, som må opsoniseres for effektiv fagocytose. Opsonisering skjer ved binding av antistoffer og/eller komplementfaktorer til bakterien. Antistoff og komplementfaktorer er da opsoniner. Alle antistoffer av IgG type har evnen til å indusere fagocytose [53, 54].

IgG-antistoffer kan deles inn i 4 subklasser, IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4, som vist på figur 1.7. Subklasse 1 dominerer blant IgG antistoffene med 60-65 % av total-IgG. IgG2 utgjør 20-25 %, IgG3 5-10 % og IgG4 3-6 % [55]. Barn når samme nivå som voksne av IgG1 og IgG3 i tidlig alder mens nivået av IgG2 og IgG4 ikke oppnås før ved 10-års alder [55-57]. Hvilken subklasse av antistoffer som dannes påvirkes av flere faktorer, blant annet type antigen, antigenets vei inn i kroppen, eksponeringsvarighet, genetiske faktorer og alder [58]. IgG antistoffer mot peptidantigener er vanligvis subklasse 1 og 3, mens karbohydratantigener hovedsakelig gir antistoffer av subklasse 2 hos voksne og IgG1 (eller IgG1 og IgG2) hos barn [59]. Karbohydratantigener kan også gi produksjon av betydelig mengde antistoffer av subklasse 1 som vist for meningokokk A og C antikapsulære antistoffer [60]. Antistoffer av subklasse 4 produseres vanligvis etter langvarig antigenstimulering og parasittære infeksjoner [58].



**Figur 1.7 Skjematisk oversikt over strukturen til de 4 IgG subclassene**

*Gjengitt med tillatelse fra Audun Aase*

De fire subclassene av IgG har ulike biologiske egenskaper. Det er store forskjeller i effektorfunksjoner og evne til å aktivere komplement [61, 62]. IgG1 og IgG3 har god evne til å aktivere komplementsystemet, mens IgG4 ikke aktiverer komplement. IgG2 er bare effektiv til komplementaktivering når de er bundet til antigen med høy epitopetetthet [21, 62-64]. De forskjellige subclassene fremme fagocytose i ulik grad ved at de ikke har samme evne til å binde seg til membransreptorer på fagocytter. IgG1 og IgG3 er vanligvis de mest effektive av subclassene til dette [53, 54, 65].

## ***IgM***

Antistoffer av IgM type utgjør omtrent 10 % av total mengde immunglobulin [22]. IgM opptrer vanligvis som en polymer med fem monomere enheter og finnes stort sett i sirkulasjonen. Immunglobuliner av IgM type har vanligvis lav bindingsstyrke, men tilstedeværelsen av flere bindingssteder vil til en viss grad kompensere for dette [21]. IgM er en viktig reseptor i sin membranbundne form, hvor IgM opptrer som monomer, og finnes på overflaten til umodne og modne B lymfocytter [66, 67]. Produksjon av IgM-antistoffer kan induseres uten hjelp av T-lymfocytter [21]. IgM dominerer således i tidlig fase av den primære immunresponsen ved infeksjonssykdommer [20].

IgM-pentameren har spesielle forutsetninger for å agglutinere partikulært materiale, som for eksempel mikroorganismer. Dette gjør at IgM kan nøytralisere mikroorganismer og hindre videre spredning [20]. Binding av antigen til IgM-molekylet fører også til kraftig komplementaktivering via den klassiske vei og bidrar på denne måten til den innledende

delen av immunresponsen [20, 21]. IgM-antistoffene fremmer også fagocytosen av patogener [68].

### **1.3.4 Affinitet og aviditet**

Kreftene som binder antistoff og antigen sammen er bindinger av ikke-kovalent karakter, kan være ionebindinger, hydrogenbindinger, van der Waalske bindinger eller bindinger som skyldes hydrofobe interaksjoner [20, 25]. Affinitet er et begrep som brukes om bindingsstyrken mellom et antigen og et enkelt bindingssete [20]. De ikke-kovalente bindingene kan brytes, og affiniteten uttrykker sannsynligheten for at dette kan skje [25]. Aviditet er et uttrykk for funksjonell affinitet. Med dette menes at for eksempel IgM-antistoffer som ofte har lav affinitet, men ti bindingsseter har spesielle forutsetninger for å bruke ett eller flere av disse til å være bundet til antigener [20]. Antistoffenes affinitet for dets tilhørende antigen er vist å være en avgjørende faktor for antistoffets effektivitet [69].

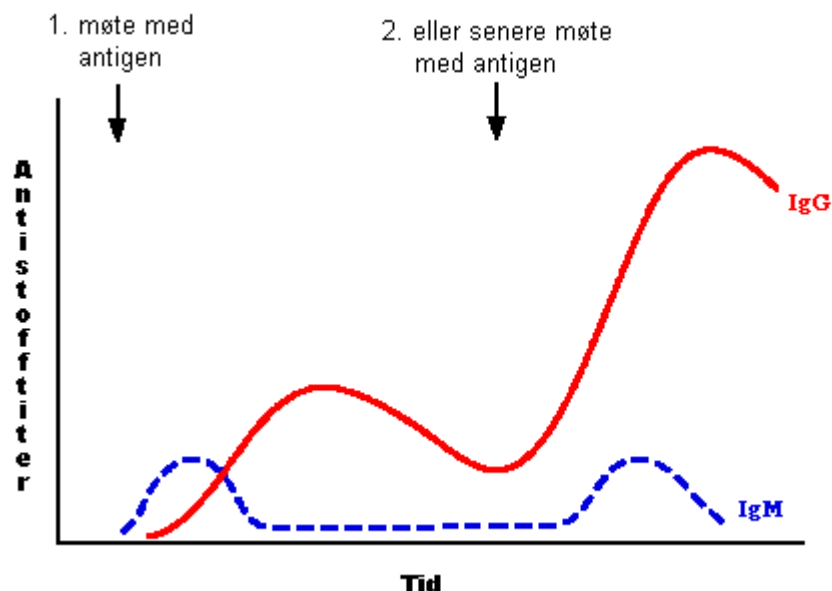
Flere studier av konjugatvaksiner har vist at vaksinerer inducerer en økning i antistoffenes aviditet [70, 71]. Underveis i antistoffresponsen øker gjennomsnittlig affinitet av alle antistoffer i serum. Dette skyldes seleksjonen av høy-affinitets B-celler og antistoffer. Til sammen gjør dette at antistoffet som dannes senere i immunresponsen og i etterfølgende responser er bedre tilpasset til antigenet det er rettet mot [25].

### **1.3.5 Primær- og sekundærrespons**

Som tidligere nevnt har det ervervede immunforsvaret hukommelse. Dette fører til at andre og eventuelle senere møter med samme antigen gir en raskere og kraftigere immunrespons. Immunresponsen ved første gangs møte med antigenet kalles primærresponsen og ved andre gangs møte kalles den sekundærresponsen [20].

Primærresponsen er karakterisert ved tidlig og dominerende produksjon av IgM som kan være induert både av thymus-uavhengige og thymus-avhengige antigener fra mikroorganismer. Etter hvert øker også IgG-produksjonen og mot slutten av primærresponsen vil det skje en affinitetsmodning av IgG. I tillegg dannes det hukommelsesceller og langlivede plasmaceller. Etter at infeksjonene er over, vil det kunne påvises spesifikt IgG, produsert av de langlivede plasmacellene [35, 36], i mange år, ofte livet ut.

Ved senere møter med samme antigen vil sekundærresponsen føre til en raskere og kraftigere produksjon av IgG med økende grad av affinitetsmodning. I tillegg opptrer ofte en forbigående IgM-respons [21, 22].



**Figur 1.8 Primær- og sekundærrespons**

*Antistoffrespons ved første møte med antigen (primærrespons) og ved andre eller senere møte med samme antigen (sekundærrespons)*

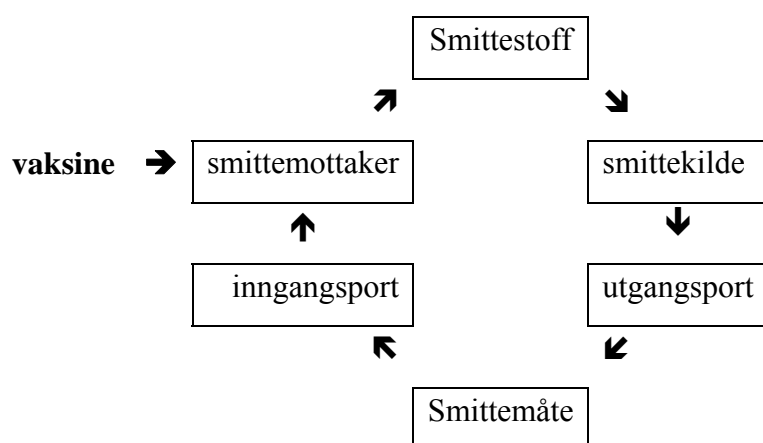
Måling av spesifikt IgG benyttes ofte for å vurdere et individs ”immunstatus”. Dette gir informasjon om hvorvidt individet har gjennomgått en infeksjon [21].

## 1.4 Vaksiner og immunisering

For å forebygge utvikling av sykdom etter smitte, kan kroppen stimuleres til å danne antistoffer på kunstig vis. Dette kan gjøres ved vaksiner. Vaksiner blir benyttet for å oppnå immunologisk beskyttelse og immunologisk hukommelse. Vaksiner er det enkleste og mest effektive middelet for forebygging av sykdommer som skyldes patogene mikroorganismer [4, 25].

Prinsippet for vaksiner er at det tilføres antigener fra den mikroorganismen som forårsaker sykdom. Antigenene er da behandlet på en slik måte at de ikke fremkaller sykdom, samtidig som de har sine antigene egenskaper intakt. Immunsystemet vil da reagere på antigenet og indusere dannelse av antistoffer og hukommelseceller [22, 23].

Mange infeksjonssykdommer forekommer ikke lenger i Norge, men de finnes fortsatt andre steder i verden. Det er derfor av stor betydning og opprettholde immunologisk beskyttelse i befolkningen gjennom vaksinasjon [4]. Figur 1.8 viser hvordan smittekjeden kan brytes ved vaksinasjon.



**Figur 1.9**      **Hvordan smittekjeden kan angripes ved vaksinasjon**

*Fra Medisinsk mikrobiologi av Degré et al. [32]*

I Norge i dag har vi et anbefalt vaksinasjonsprogram for barn og ungdom. Hovedhensikten med vaksinasjonsprogrammet er å beskytte den enkelte mot sykdom samtidig som smittespredning i befolkningen reduseres [4].

Det finnes flere typer vaksiner. Vaksiner kan være basert på hele mikroorganismer, rensede enkeltkomponenter, rekombinante vektorer eller DNA vaksiner. Vaksiner basert på hele mikroorganismer og rensede enkeltkomponenter er de vaksinetypene som er aktuelle mot bakterier [20, 22].

Mange vaksiner er basert på hele mikroorganismer. For å unngå alvorlig sykdomsutvikling inaktiveres eller svekkes mikroorganismene. Immunresponsen er avhengig av hvilken av de to variantene som benyttes. Svekkede mikroorganismer er som regel i stand til å utvikle seg etter injeksjon i en vertsorganisme og dette vil gi en kraftigere immunrespons enn inaktiverede mikroorganismer som ikke utvikler seg [20, 22].

For å unngå noen av farene ved bruk av hele mikroorganismer er det utviklet vaksiner som er basert på rensede enkeltkomponenter. Enkeltkomponenter kan være inaktiverte eksotoksiner, rekombinante antigener, polysakkarider og peptider [20, 22].

Immunresponsen kan ofte forbedres ved å tilsette en annen substans sammen med antigenet. Denne substansen kalles adjuvans og induserer en sterkere og vedvarende immunrespons. Den mest brukte adjuvans i kommersielle vaksiner i dag er aluminium hydroksid (Alum) [20]. Det er foreløpig ikke fullstendig klarlagt hva effekten av adjuvans skyldes. Virkningsmekanismene er antakelig flere og sammensatte. Sannsynligvis skyldes noe av effekten at antigenet frigjøres langsommere og at konsentrasjonen opprettholdes over lenger tid enn dersom adjuvans ikke var tilsatt [72]. Alums egenskaper som adjuvans er også assosiert med induksjon av Th2-cellerespons i dyremodeller [73]. Det utvikles stadig flere immunstimulerende midler, og man ønsker etter hvert å kunne påvirke spesifikke effektorsystemer i større grad enn man kan i dag [20, 25].

I tillegg til vaksinasjon som gir en aktiv immunisering ved at kroppen selv produserer antistoffer mot antigenet, kan man også oppnå beskyttelse mot mikroorganismer ved passiv immunisering. Da tilføres kroppen antistoffer som allerede er dannet i andre individer. Dette skjer naturlig i svangerskapet der antistoffer passerer placenta og overføres til fosteret og ved amming der barnet får i seg antistoffer fra moren via morsmelken. En annen måte for passiv immunisering er å injisere monoklonale antistoffer fremstilt ved DNA teknologi intramuskulært. Dette benytter man seg av i forbindelse med reiser og ved behandling av enkelte sykdommer [20, 22].

### **1.4.1 Vaksiner mot meningokokker**

De første vaksinene utviklet mot meningokokker var polysakkaridvaksiner. Disse er basert på rensede kapsulære polysakkarider og finnes mot meningokokker av serogruppe A, C, Y og W-135 [74, 75]. Disse vaksinene har imidlertid vist seg å være mindre immunogene hos barn under 2 år [76]. I tillegg har det blitt rapportert at flere doser av polysakkaridvaksinen har induisert redusert respons mot gruppe C polysakkarid og i den senere tiden også mot gruppe A polysakkarid [77]. Det har derfor blitt utviklet konjugatvaksiner for gruppe A og C for å øke immunogenisiteten og immunitetens varighet, spesielt for små barn [78]. Konjugatvaksiner



lages ved å konjugere polysakkaridet til et bærerprotein. Dette gjør antigenet til et thymus-avhengig antigen som medfører immunologisk hukommelse [79].

Kapsulært polysakkarid hos meningokokker av serogruppe B er imidlertid lite immunogen hos mennesker [80] og kryssreagerer med komponenter som finnes i humant nervevev. Dette kan teoretisk gi opphav til autoimmunitet [81]. Vaksiner basert på yttermembranvesikler (OMV) har derfor blitt utviklet, blant annet i Norge [82]. OMV vaksinene består hovedsakelig av yttermembranproteiner (OMP) fra *N.meningitidis*, og spesielt PorA komponenten er vist å være et viktig mål for baktericide antistoffer [83].

En oversikt over kommersielt tilgjengelige meningokokkvaksiner i Norge per 2005 er vist i tabell 1.2. Det finnes foreløpig ingen kommersielt tilgjengelig vaksine mot meningokokker, gruppe B [84].

**Tabell 1.2      Kommersielt tilgjengelige meningokokkvaksiner i Norge**

<b>Vaksinens Navn</b>	<b>Beskytter mot meningokokker gruppe:</b>	<b>Type vaksine</b>
Mencevax AC	A og C	<i>Polysakkaridvaksiner</i>
Meningovax A+C	A og C	<i>Polysakkaridvaksiner</i>
Mencevax A+C+W+Y	A, C, W og Y	<i>Polysakkaridvaksiner</i>
Meningitec	C	<i>Konjugatvaksiner</i>
Neis Vac-C	C	<i>Konjugatvaksiner</i>

Meningokokkvaksine inngår ikke i vaksinasjonsprogrammet i Norge, men brukes kun i spesielle epidemiologiske situasjoner og ved enkelte utenlandsopphold [10].

## 1.5 Hensikt med oppgaven

Den norske OMV vaksinen mot gruppe B meningokokker (MenBvac<sup>TM</sup>) har vist beskyttende egenskaper i en stor, dobbeltblind klinisk studie [82]. Denne oppgaven er et ledd i undersøkelsene for å bedre forståelsen av denne vaksinens beskyttende evne.

Hovedhensikten var å undersøke immunresponsen av IgG1 og IgG3 mot den norske vaksinstammen (44/76) etter vaksinasjon med 1, 2 og 3 doser samt kryssreaksjon mot en ulik

gruppe B meningokokkstamme (NZ 98/254) isolert fra en pasient i New Zealand. Dette for å undersøke vaksinens beskyttende evne mot forskjellige gruppe B meningokokkstammer. Det er tidligere vist at antistoffer mot meningokokker kan kryssreagere mot andre stammer. Kryssreagerende antistoffer har blitt oppdaget blant annet mot flere yttermembranproteiner og lipopolysakkarider (LPS) [85, 86]. Det er ønskelig å indusere kryssreagerende antistoffer da disse vil gi bedre beskyttelse mot flere stammer av en bakterie [87].

I tillegg ønsket vi å undersøke affinitetsmodningen for antistoffene etter vaksinasjon med 1, 2 og 3 doser av vaksinen. Prøvene skulle også brukes til å isolere IgG1 og IgG3 for å studere affinitet for å se om det eventuelt fantes en kooperasjon mellom subklassene i serum. Også for denne delen av studien skulle eventuell kryssreaksjon mot den andre stammen undersøkes. Effektiviteten av antistoffenes beskyttelse avhenger blant annet av antistoffenes aviditet [88].

Resultatene kan gi ny kunnskap om IgG subklassene i relasjon til immunologisk beskyttelse ved vaksinasjon med den norske gruppe B meningokokkvaksinen.

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 Vaksinen

Meningokokkvaksinen benyttet i dette forsøket ble utviklet og produsert ved Folkehelseinstituttet i Norge. Vaksinen ble preparert fra en meningokokkstamme 44/76 (B:15:P1.7,16:L3,7,9) som ble isolert fra en norsk pasient med et dødelig tilfelle av meningitt og septikemi i 1976 [89]. Produksjonsprosessen var basert på metoder utviklet av Zollinger *et al.* [90] og Helting *et al.* [91]. Bakterien ble dyrket og deretter ekstrahert med deoxycholate. Yttermembranvesikler (OMV) ble rensert ved hjelp av ultrasentrifugering og adsorbert til aluminiumhydroksid som adjuvans. OMV inneholdt proteiner av klasse 1, 3, 4 og 5 samt noen høymolekylære proteinkomponenter. Realtivt til protein inneholdt vaksinen også omtrent 8 % fosfolipid, 7 % lipopolysakkarider og 16 % deoxycholate. Vaksinen var ikke pyrogen hos mennesker i ordinære doser og var meget immunogen hos mus og mennesker [82, 92].

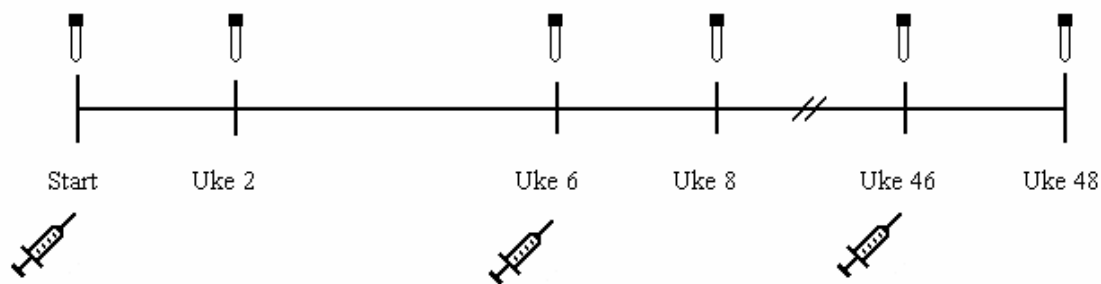
En dose, 0,5 mL, inneholdt 25 µg protein, 2 µg LPS og 1,67 mg Al(OH)<sub>3</sub> [92] og ble injisert intramuskulært i deltoidmuskelen.

### 2.2 Forsøkspersoner, immuniseringsskjema og prøveinnsamling

10 friske, frivillige forsøkspersoner med negativ anamnese for meningokokksykdom deltok i forsøket. Alle ble selektert til forsøket på grunn av lavt nivå av serum IgG mot gruppe B meningokokker. 3 menn og 7 kvinner i alderen fra 24-49 år (median alder 40 år) ble inkludert i forsøket. 2 av forsøkspersonene (2 og 3) hadde 10 år tidligere blitt vaksinert med en eksperimentell meningokokk gruppe B vaksine. Denne vaksinen inneholdt yttermembranproteiner fra to meningokokkstammer, 44/76 (B:15:P1.7,16) og 8047 (2b:P1.2) sammensatt med kapsulære polysakkarider fra serogruppe A, C, Y og W-135 [93, 94]

Det ble gitt to doser av vaksinen med 6 ukers mellomrom og en tredje dose 46 uker etter første dose. Ved hver vaksinasjon ble det tatt blodprøver samt 2 og 6 uker senere. Etter 3. vaksinasjon ble det i tillegg tatt prøver etter 1 uke og 3, 8 og 12 måneder. Parallelt med blodprøvene ble det også tatt halsprøver for å undersøke eventuelt bærerforhold hos forsøkspersonene [95]. Ingen av forsøkspersonene viste seg å være bærere i løpet av studieperioden. Serumet ble lagret ved -20 °C fram til analysering. Det ble også tatt

plasmaprøver av forsøkspersonene ved de ulike prøvetakingstidspunktene. Plasma ble fortynnet 1+1 med saltvann for å separere leukocytter og lagret ved -20 °C fram til analysering. Blodprøvene benyttet til dette forsøket var prøvene som ble tatt ved hver vaksinasjon samt to uker etter vaksinasjon. Prøvene som ble tatt 2 uker etter vaksinasjon ble valgt da tidligere forsøk har vist at disse prøvene har høyest konsentrasjon av antistoffer [96].



**Figur 2.1**      **Oversikt over tidsforløpet for vaksinerings og prøvetaking**

## 2.3 ELISA

”Enzyme-linked immunosorbent assay”, ELISA, er en immunologisk metode for å kvantitere eller påvise antistoff (indirekte ELISA) eller antigen (direkte ELISA) i en prøve.

I dette forsøket ble det benyttet indirekte ELISA, da det var antistoffer i serum som skulle kvantiteres.

Prinsippet for indirekte ELISA er at ønsket antigen adsorberes til bunn og vegger i mikrotiterplater (ELISA-plater). Prøve tilsettes og antistoffer i prøven (primært antistoff) rettet mot det bestemte antigenet bindes. Ubundet antistoff fjernes ved en vaskeprosedyre og deretter tilsettes et sekundært antistoff konjugert med enzym som binder seg til det primære antistoffet. Ubundet sekundært antistoff fjernes ved vasking. Deretter tilsettes enzyms substrat som er fargeløst. Enzymet katalyserer omdanning av substratet til et farget reaksjonsprodukt som kan måles spektrofotometrisk. Intensiteten til fargen er proporsjonal med mengde antistoff i prøven. Figur 2.2 viser de generelle trinnene i metoden.

1) Binding av antigen til overflaten i brønnene på ELISA-platen (coating)

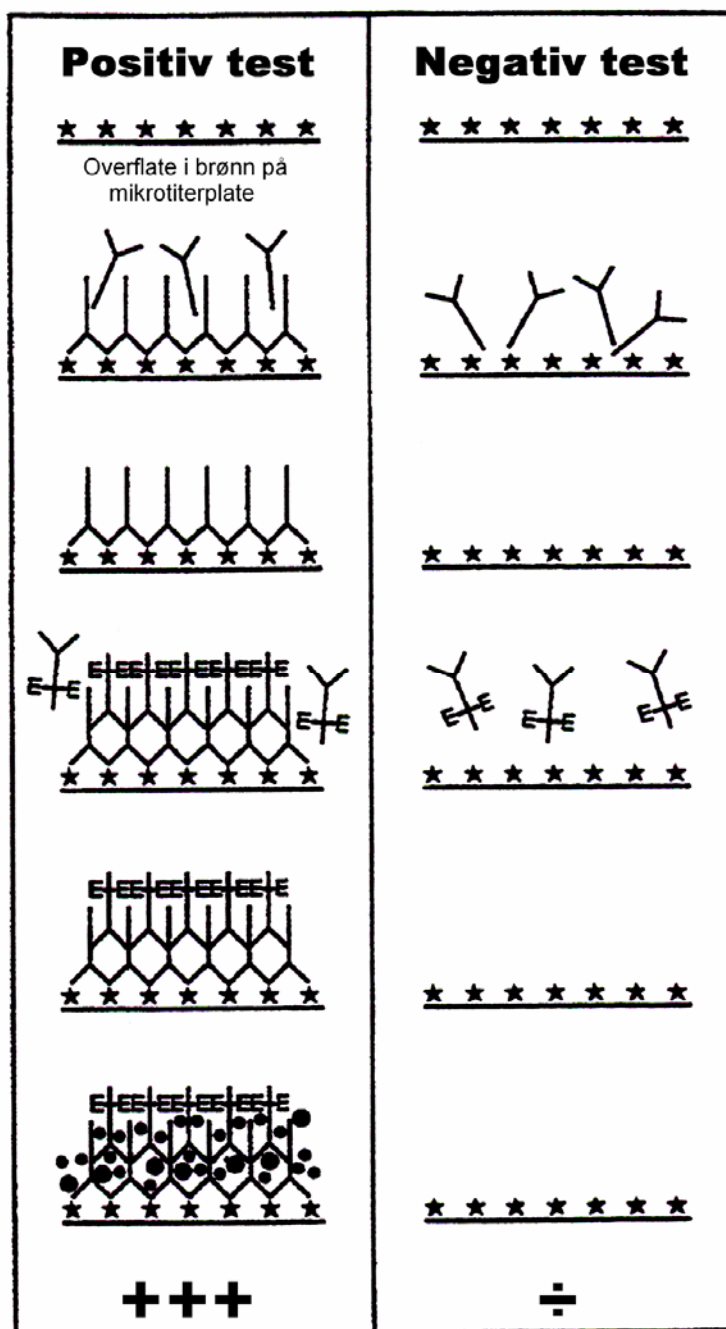
2) Prøver tilsettes. Antistoff bindes til antigenet.

3) Overskudd vaskes av.

4) Anti-antistoffer konjugert til enzym tilsettes.

5) Overskudd vaskes av.

6) Enzymsubstrat tilsettes. Mengde av farget produkt (●) måles. Antistoffmengden kan deretter beregnes ved hjelp av standardkurve.



**Figur 2.2** Skjematisk fremgangsmåte for indirekte ELISA

I dette forsøket ble det, avhengig av formål, benyttet flere varianter av nevnte metode.

### 2.3.1 Kvalitetssikring

På grunn av begrenset tid til gjennomføring av oppgaven ble alle forsøkene kun utført en gang. For å kvalitetssikre resultatene ble det inkludert kontroller og standard på alle ELISA-plater som ble analysert. I tillegg til de nevnte kontrollene ble alle prøver analysert i

duplikater på ELISA-platene. Duplikatene avslører om det er variasjoner på hver enkelt ELISA-plate.

### **Positiv kontroll**

Som positiv kontroll ble det benyttet serum som var kjent positiv for IgG1 og IgG3 mot OMV fra meningokokk gruppe B stamme 44/76. Denne ble brukt som en intern kontroll på alle oppsett som ble analysert for å kontrollere reproduserbarheten slik at resultatene kunne sammenlignes. Positiv kontroll ble benyttet ved kvantitering av total IgG, IgG1 og IgG3 samt ved aviditetsmåling.

### **Negativ kontroll**

Som negativ kontroll ble det benyttet serum som var kjent negativ for OMV meningokokk gruppe B. Denne ble benyttet ved kvantitering av total IgG, IgG1 og IgG3 og var en kontroll på uspesifikk binding av serumkomponenter. Den ble også benyttet som en indikator på hvilken respons en kjent negativ prøve gir slik at negative prøver kunne identifiseres.

### **Spesifisitetskontroll av subklasse-spesifikke antistoffer**

Ved kvantitering av IgG1 og IgG3 ble det i tillegg benyttet en kontroll av eventuell kryssreaksjon. Dette ble gjort ved at høyeste fortykning av standard, kontroll og prøver ble tilsatt i to ekstra brønner hver. Disse brønnene ble ikke tilsatt de spesifikke antistoffene, men gjennomgikk ellers alle andre trinn i analysen. Dette var en kontroll på at antistoffet i konjugatet ikke reagerte med antistoffer bundet til coat og at konjugatet ikke reagerte med coat.

### **Standard for total IgG, IgG1 og IgG3**

I tillegg til kontroller ble det også benyttet standard. Dette var et serum med kjent konsentrasjon av antistoffene mot OMV fra meningokokk gruppe B stamme 44/76. Konsentrasjonen av total IgG, IgG1 og IgG3 hadde blitt bestemt ved Folkehelseinstituttet ved tidligere undersøkelser. Standarden ble benyttet ved kvantitering av total IgG, IgG1 og IgG3 og ble satt opp på hver ELISA-plate som ble analysert.

Undersøkelser som sammenlignet standardens respons mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254 viste at responsen mot OMV NZ 98/254 utgjorde omtrent 1/3 av responsen mot OMV 44/76 (målt i absorbans). For å ha omtrent sammenfall mellom AU og  $\mu\text{g/mL}$  for antistoffer mot NZ 98/254 ble konsentrasjonen av standarden satt til 1/3 av kjent verdi når den ble benyttet til analyser mot OMV NZ 98/254.

**Tabell 2.1**    *Konsentrasjoner benyttet for standarden for total IgG, IgG1 og IgG3 mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254*

	<b>Total IgG</b>	<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>
OMV 44/76	164,4 $\mu\text{g/mL}$	130 $\mu\text{g/mL}$	44,5 $\mu\text{g/mL}$
OMV NZ 98/254	54,8 AU	43,3 AU	14,8 AU

### **2.3.2 Kvantitering av total IgG ved ELISA-metode**

#### **Praktisk utførelse**

#### **Utstyr og reagenser**

- Mikrotiterplater med flat bunn – Intermed Nunc-Immunoplate Maxisorb F96
- Plastfolie
- Finnpiptetter 0,5-1000  $\mu\text{L}$  fra Thermo Labsystems
- Gaffelpipette 100  $\mu\text{L}$  fra Thermo Labsystems
- Pipettetipper
- ELISA-vasker – Skatron Skanwasher 300
- ELISA-mikrotiterplate avleser – Molecular Device Thermomax (405 nm)
- PC med:
  - SoftMax for Windows fra SoftMax Inc.
  - GraphPad Prism 4 fra GraphPad Software Inc.
- Erlenmeyerkolber
- Varmeskap innstilt på 37 °C

Reagenser, se vedlegg 1.

***”Coating” av ELISA-platene***

For at antistoffer skal kunne binde seg til ELISA-platene, må brønnene på ELISA-platene dekkles med antigen (”coates”). OMV preparat isolert fra to ulike meningokokkstammer, 44/76 og NZ 98/254 ble brukt som coat på hver sine plater. OMV fra meningokokkstamme 44/76 er det samme som vaksinen er laget av. Det er viktig at konsentrasjonen av coatematerialet er tilstrekkelig høy slik at brønnene blir mettet med antigen. Dette vil gi tester med høy følsomhet. Under inkubering vil antigenet (OMV) passivt adhere seg til plastoverflaten på ELISA-platen og ”sitte fast” under resten av ELISA-prosedyren. Erfaringer fra tidligere analyser hos Folkehelseinstituttet har vist at 4 µg/mL er en egnet konsentrasjon av OMV til dette formålet.

OMV-løsningene ble fortynnet til 4 µg/mL i coatingsbuffer. Hver brønn ble deretter tilsatt 100µL. De ferdige platene ble dekket med plastfolie og inkubert ved 4°C i minimum 2 døgn.

***Vaskeprosedyre***

Coatede plater må vaskes for å fjerne overskudd av antigen før de kan brukes. Hver plate ble vasket i ELISA-vasker med et program for 5 vaskesykluser, se vedlegg 2. Etter at vaskeprosedyren var ferdig ble eventuelle rester av vaskeløsningen tømt ut.

***Applisering av prøver, standard og kontroller***

Serumprøvene ble fortynnet med fortynningsbuffer i to-folds fortynningsrekker, 8 trinn totalt, med startfortynning 1:40. På hver plate ble det også tilsatt standard og positiv og negativ kontroll. Standarden ble fortynnet til startkonsentrasjon 1 µg/mL (0,33 AU) og deretter to-folds fortynningsrekke til totalt 8 trinn. Positiv og negativ kontroll ble fortynnet på samme måte som serumprøvene. Hver fortynning ble tilsatt platen i duplikater og det ble tilsatt 100 µL i hver brønn. I tillegg ble det i to av brønnene per plate tilsatt kun fortynningsbuffer. Disse brønnene fungerte som ”blank” ved avlesning. Alle prøvene ble applisert på en plate med coat fra 44/76 og en plate med coat fra NZ 98/254. Platene ble inkubert ved romtemperatur over natt og deretter vasket i ELISA-vasker som beskrevet under vaskeprosedyre over.

Bufferen som ble benyttet til fortynning var tilsatt BSA (bovint serum albumin). Dette ble gjort for å blokkere seter på plastoverflaten i brønnene som ikke var dekket av antigen og på den måten hindre uspesifikk binding av andre reaktanter.



**Applisering av konjugat**

Konjugatet ble laget av:

- biotinyllert antistoff (med spesifikk reaktivitet for antistoffene fra prøver, standard og kontroller som ønskes detektert)
- biotinyllert enzym, alkalisk fosfatase (ALP)
- streptavidin (som kobler de to biotinyllerte komponentene sammen)

Antistoffet var fremstilt på Folkehelseinstituttet og renses ved hjelp av affinitetskromatografi med søyler som hadde koblet spesifikke antigener på seg. Både antistoff og enzym var konjugert med biotin ved Folkehelseinstituttet.

Biotin er et lite vannløselig vitamin som produseres av planter og mikroorganismer. Ulike biotinderivater kan som regel kobles til ulike grupper på proteinene uten at disse taper biologisk aktivitet. Streptavidin er et glykoprotein som har fire bindingssteder med ekstrem høy affinitet for biotin og binder dermed biotinyllerte komponenter sammen. Tidligere erfaring ved Folkehelseinstituttet med denne type ELISA-analyse har vist at biotinyllert antistoff-streptavidin-biotinyllert enzym gjerne kan tilsettes som en blanding.

Konjugatkomponentene ble fortynnet i fortynningsbuffer til ønsket konsentrasjon i følgende rekkefølge:

1. biotinyllert antistoff
2. biotinyllert enzym
3. streptavidin

På denne måten unngår man da problemer med at alle bindingssetene på streptavidin blir okkupert av kun en av de biotinyllerte komponentene. 100 µL av konjugatløsningen ble tilsatt hver brønn. Platene ble inkubert med konjugatblandingen ved 37°C i 2 timer og deretter vasket i ELISA-vasker som tidligere beskrevet.

**Applisering av substrat**

NPP (*p*-nitrofenylfosfat) ble brukt som enzymsubstrat. NPP spaltes av ALP og gir *p*-nitrofenol som har en gul farge som kan måles i en ELISA-avleser (fotometer). Løsningen ble laget ved å løse opp NPP-tabletter i 10 % dietanolaminbuffer, pH 9,8. 1 tablett ble løst i 5 mL

buffer til en konsentrasjon på 1 mg/mL. NPP-tablettene må løses i bufferen like før bruk. 100 µL av substratløsningen ble tilsatt hver brønn. Platene ble inkubert ved 37°C til ønsket Absorbans og umiddelbart avlest.

### ***Avlesing***

Platene ble avlest etter 20-30 minutter på ELISA-leser ved 405 nm og absorbans ble registrert. Tidspunkt for avlesning var når den sterkeste prøven hadde oppnådd en absorbans på omtrent 1,0. Brønnene som ble tilsatt fortynningsbuffer i stedet for prøve ble brukt som blank. Programmet SoftMax ble benyttet for avlesning. SoftMax er et spektroskopisk analyseprogram som kobles til ELISA-avleseren. Det angis om prøven er en ukjent prøve, kontroll eller standard, samt fortynning/konsentrasjon og eventuelle navn på prøvene. Disse opplysningene kan benyttes til å beregne standardkurve og konsentrasjon i prøvene.

### ***Beregning***

På hver plate ble det påsatt en standard med kjent konsentrasjon. Absorbansene fra denne standarden ble benyttet for å lage en standardkurve. Ut fra standardkurven ble konsentrasjonen av antistoff i prøvene og kontrollene beregnet. Se vedlegg 3 for eksempel på beregning. Alle beregninger ble utført ved hjelp av resultater fra Softmax og GraphPad Prism. GraphPad Prism er et program for analysering og organisering av data, for eksempel grafisk fremstilling og statistiske beregninger.

### ***2.3.3 Kvantitering av IgG1 og IgG3 ved ELISA-metode***

For å kvantitere antistoffer av IgG1 og IgG3 type ble det inkludert et tilleggstrinn i forhold til kvantitering av total IgG. I dette trinnet ble det benyttet muse-monoklonale antistoffer som var spesifikke for humane IgG-subklasser av type IgG1 og IgG3.

Kvantitering av IgG1 og IgG3 ble utført i serumprøver og isolerte fraksjoner av IgG1 og IgG3 samt i urene fraksjoner for å bestemme graden av forurensing.

## **Praktisk utførelse**

### ***Utstyr og reagenser***

Se utstyr under punkt 2.3.2.

Reagenser, se vedlegg 1.

### ***"Coating" av ELISA-platene***

Se coating under punkt 2.3.2.

### ***Vaskeprosedyre***

Se vaskeprosedyre under punkt 2.3.2.

### ***Applisering av prøver, standard og kontroller***

Serumprøvene ble fortynnet med fortynningsbuffer i to-folds fortynningsrekke, 8 trinn totalt, med startfortynning 1:20. På hver plate ble det også tilsatt standard, positiv og negativ kontroll, samt brønner til kontroll for uspesifikk binding for hvert enkelt serum. Standarden ble fortynnet til startkonsentrasjon 0,8125 µg/mL (0,27 AU) for bestemmelse av IgG1 og 1,1125 µg/mL (0,37 AU) for bestemmelse av IgG3 og deretter to-folds fortynningsrekke til totalt 8 trinn. Positiv kontroll ble fortynnet på samme måte som serumprøvene. Negativ kontroll ble kun tilsatt i en fortynning, 1:20. Hver fortynning ble tilsatt platen i duplikater, og det ble tilsatt 100 µL i hver brønn. I tillegg ble det i to av brønnene tilsatt kun fortynningsbuffer. Disse brønnene fungerte som "blank" ved avlesning. Alle prøvene ble applisert på to plater med OMV fra 44/76 og to plater med OMV fra NZ 98/254, en av hver OMV for bestemmelse av IgG1 og en av hver for IgG3. Platene ble inkubert ved romtemperatur over natt for å oppnå reaksjonlikevekt og deretter vasket i ELISA-vasker som beskrevet under vaskeprosedyre i punkt 2.3.2.

### ***Applisering av spesifikke antistoff mot IgG1 og IgG3***

De spesifikke antistoffene for IgG1 og IgG3 ble fortynnet til ønsket fortynning i fortynningsbuffer, en fortynning for IgG1 og en for IgG3. 100 µL av antistofffortynningen for IgG1 ble tilsatt de brønner der IgG1 skulle kvantiteres og tilsvarende for IgG3. Platene ble

inkubert ved 37°C i 2 timer og deretter vasket i ELISA-vasker som beskrevet under vaskeprosedyre i punkt 2.3.2.

### ***Applisering av konjugat***

Applisering av konjugat ble utført som beskrevet under punkt 2.3.2, men det ble benyttet et annet biotinyleret antistoff, se vedlegg 1.

### ***Applisering av substrat***

Se applisering av substrat under punkt 2.3.2.

### ***Avlesing***

Avlesning ble utført som beskrevet under punkt 2.3.2, men platene ble for denne metoden avlest etter 60-90 minutter.

### ***Beregning***

Beregning ble utført som beskrevet under punkt 2.3.2.

## ***2.3.4 Måling av aviditet ved ELISA-metode***

Aviditet måles også ved å benytte en variant av ELISA-metoden. Ved denne metoden kan man sammenlikne ulike antistoffers bindingsstyrke til et bestemt antigen/en bestemt coat eller et antistoffs bindingsstyrke til ulike antigener/coater. Analysen egner seg kun til innbyrdes sammenlikning av bindingsstyrken og gir ikke en eksakt og uavhengig aviditetsverdi.

### ***Praktisk utførelse***

Måling av aviditet ble utført for total IgG, IgG1 og IgG3 i serum og for rene fraksjoner av IgG1 og IgG3.

### ***Utstyr og reagenser***

- Vekt – Sartorius BP 121S

Ellers som utstyr under punkt 2.3.2.

Reagenser, se vedlegg 1.

***"Coating" av ELISA-platene***

Se coating under punkt 2.3.2.

***Vaskeprosedyre***

Se vaskeprosedyre under punkt 2.3.2.

***Applisering av prøver og kontroller***

Ved denne analysen ble hver av prøvene kun påsatt i en konsentrasjon. Denne konsentrasjonen ble bestemt ved å utføre en tilsvarende analyse som for kvantitering av henholdsvis total IgG, IgG1 og IgG3, men alle prøver ble avlest etter 60 minutter. Dette for å bestemme hvilken fortynning som ga absorbans tilnærmet eller nærmest 1,0 på dette tidspunktet. Denne fortynningen ble benyttet videre i analysen.

Hver prøve og kontrollen ble fortynnet til ønsket konsentrasjon i fortynningsbuffer. 100 µL av hver enkelt prøve ble tilsatt i 2x7 brønner. Platene ble inkubert ved 37°C i 2 timer og deretter vasket i ELISA-vasker som beskrevet under vaskeprosedyre i punkt 2.3.2.

***Applisering av ammoniumthiocyanat***

Ammoniumthiocyanat ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) er et kaotropt stoff som settes til hver enkelt prøve i en fortynningsrekke. Kaotrope ioner dissosierer antigen-antistoff komplekser ved å forstyrre vannets struktur i det intermolekylære mellomrommet og redusere hydrofobe interaksjoner [97]. Dette stoffet vil da i ulik grad løse antistoffene fra antigenet. Desto høyere konsentrasjon av det kaotrope stoffet som må til for å løse bindingene mellom antistoffet og antigenet, desto høyere bindingsstyrke/aviditet har antistoffet. Ammoniumthiocyanatløsning ble laget ved å veie inn tørrstoff og fortynne i PBS til ønsket konsentrasjon. Konsentrasjonene som ble benyttet var 0.2M, 0.5M, 1.0M, 2.0M, 3.0M og 4.0M.

100 µL av de ulike konsentrasjonene ble tilsatt i duplikater for hver av prøvene. To av brønnene for hver prøve ble ikke tilsatt ammoniumthiocyanatløsning. Absorbansen for disse brønnene ble senere benyttet som utgangspunkt for beregningene av aviditet. Platene ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur og deretter vasket i ELISA-vasker som beskrevet under vaskeprosedyre i punkt 2.3.2.

**Applisering av spesifikke antistoff mot IgG1 og IgG3**

For de prøvene hvor bindingsstyrken for IgG1 eller IgG3 skulle bestemmes, ble Applisering av spesifikt antistoff mot IgG1 og IgG3 utført som beskrevet under punkt 2.3.3.

**Applisering av konjugat**

Applisering av konjugat ble utført som beskrevet for henholdsvis total IgG, IgG1 eller IgG3 avhengig av om det var aviditet mot total IgG, IgG1 eller IgG3 som skulle bestemmes.

**Applisering av substrat**

Applisering av substrat ble utført som beskrevet under punkt 2.3.2.

**Avlesing**

Avlesning ble utført som beskrevet under punkt 2.3.2, men platene ble for denne metoden avlest etter 60 minutter.

**Beregning**

Aviditet/bindingsstyrke ble beregnet ved hjelp av GraphPad Prism. De avleste verdiene ble overført til GraphPad Prism hvor verdiene ble analysert og det ble tegnet en dose-respons kurve for hver prøve. Ut i fra disse kurvene ble det deretter beregnet, ved bruk av interpolering, hvilken konsentrasjon av ammoniumthiocyanat som må til for å få en reduksjon i absorbansen på 50 % for hver av prøvene. Denne konsentrasjonen er benyttet som mål for antistoffets aviditet/bindingsstyrke.

**2.4 Kromatografi**

Kromatografi er en samlebetegnelse på separasjonsmetoder basert på prinsippet om at substansene som skal separeres fordeler seg ulikt mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil mens den andre fasen er stasjonær. Når stoffene fordeler seg ulikt mellom mobil og stasjonær fase får de også ulik elueringshastighet gjennom søylen. Stoffene får ulik retensjonstid og elueres dermed ut av søylen på forskjellige tidspunkter og ved forskjellige elueringsbetingelser [98].

For å kunne separere en blanding av stoffer kreves det at man velger en riktig kombinasjon av eksperimentelle betingelser som påvirker separasjonen. Eksperimentelle betingelser kan være for eksempel type stasjonær og mobilfase, lengde og diameter på kolonnen, trykk og temperatur og prøvens størrelse [98].

### **2.4.1 Affinitetskromatografi**

Denne metoden benytter seg av biomolekyler med høy selektivitet slik at man kan isolere forbindelser fra komplekse prøver. På denne måten kan man rense for eksempel enzym, antistoff, antigen, glykoproteiner og nukleinsyrer. Affinitetskromatografi virker ved at liganden man ønsker en biospesifikk interaksjon med gjøres uløselig. Dette kan gjøres ved kjemisk kobling til en uløslig støttesubstans, polymerisering eller inneslutningsmetode ved bruk av PAAG. Til denne metoden var det ønskelig å rense antistoff og det ble det benyttet en ferdigkoblet søyle, protein A søyle.

Protein A søylen benyttes for preparativ rensing av monoklonale og polyklonale antistoffer. Protein A produseres av en utvalgt stamme av *Staphylococcus aureus*. Protein A består av seks ulike regioner hvorav fem av disse viser sterk, spesifikk binding til Fc-delen av IgG1, IgG2 og IgG4. IgG3, av den allotypen som hovedsakelig finnes i kaukasier, bindes i ingen eller liten grad. Immobilisert protein A kan binde minst to IgG-molekyler per molekyl [99].

Søylen som ble benyttet i dette forsøket var en bruksklar 1 mL søyle, HiTrap Protein A HP, pakket med Sepharose<sup>TM</sup> gel. Renset protein A bindes til kryssbundet agarosepartikler ved hjelp av N-hydroksysuccinimid aktiveringsmetode. Denne bindingsmetoden gir høy kapasitet og ytelse. Protein As bindingskapasitet for IgG avhenger av hvilken art immunglobulinet stammer fra. Søylene benyttet i dette forsøket har en bindingskapasitet for humant IgG på omtrent 20 mg IgG/mL gel [99].

Protein A binder IgG over et stort pH-område og tillater dermed stor variasjon i bruk av buffere. Eluering oppnås ofte ved å redusere pH i bufferen. De ulike subklassene av IgG elueres ved ulik pH avhengig av hvilken art de stammer fra [99].

Tidligere undersøkelser ved Folkehelseinstituttet har vist at IgG3 elueres ved pH 7,4 og IgG1 elueres ved pH 4,0.

## **Praktisk utførelse**

Prøvene benyttet til denne metoden var plasmaprøver som var fortynnet 1:1 med fysiologisk saltvann og deretter frosset. Det ble benyttet et LC-instrument med fraksjonssamler og skriver til selve separasjonen.

## **Utstyr og reagenser**

- Sprøyter, 5 mL
- Filter, 0,45 µm
- LC-instrument, GradiFrac-system fra Pharmacia
- HiTrap Protein A HP søyle, 1 mL
- Reagensrør, 10 mL

Reagenser, se vedlegg 1.

## **Forbehandling av prøve**

I en del av prøvene som skulle separeres hadde det felt ut fibrin. Før separasjon ble alle prøvene filtrert gjennom et 0,45 µm filter for å hindre tilstopping av kolonnen.

## **Forberedelse av instrumentet**

Før prøven kunne appliseres på maskinen måtte det kontrolleres at det ikke var luft i systemet (slinger og detektor). Dette ble gjort ved å skylle gjennom systemet med destillert vann til all luft var fjernet. Deretter ble vannet i systemet erstattet med den første elueringsvæsken. Søylene ble koblet til, og også denne ble skylt med den første elueringsvæsken til eventuell luft i søylen var fjernet. Fraksjonssamleren ble fylt opp med reagensrør og skriveren innstilt etter behov for papirhastighet og sensitivitet.

## **Isolering av IgG1 og IgG3**

Omtrent 5 mL av filtrert prøve ble trukket opp i en sprøyte. Dette ble deretter injisert i systemet ved hjelp av en ventilinjektor (loopinjektor) og systemet ble startet. Som første elueringsvæske ble PBS/azid benyttet. Ved bruk av PBS/azid som elueringsvæske skulle antistoffer av IgG3 type elueres fra søylen, ettersom disse ikke bindes til søylen i særlig grad.



For å oppnå best mulig separasjon ble det forsøkt buffere med flere forskjellige pH som andre mobilfase, og det ble også forsøkt med flere etterfølgende mobilfaser med ulik pH. Buffere som ble benyttet var citratfosfatbuffer pH 6.0 og natriumacetatbuffer med pH-verdier 5.0, 4.5 og 4.0. Ved pH 4.0 ble antistoffer av IgG1 type eluert fra søylen.

Under hele elueringsprosessen ble det samlet fraksjoner på 2 mL. Fra kromatogrammet kunne man bestemme hvilke fraksjoner som innholdt mest antistoff. Disse fraksjonene ble samlet slik at hver prøve til sammen utgjorde omtrent 10 mL som kunne benyttes til videre analysering.

Når ønskede antistoffer fra hver prøve var eluert fra søylen ble systemet vasket for rester av prøven som fortsatt var bundet i søylen. Dette ble gjort ved å benytte 0,2M eddiksyre.

### ***Etterbehandling av prøver***

For å bevare aktiviteten til antistoffmolekylene som ble eluert ved sur pH ble det tilsatt 2M Tris HCl-buffer pH 9,0 for å oppnå en nøytral pH i eluatet.

### **2.4.2 Gelfiltrering**

Gelfiltrering er en kromatografisk metode som separerer substanser utelukkende etter molekylstørrelse [98].

Til det kromatografiske systemets stasjonærfase anvendes porøse pakkematerialer med en gitt porestørrelse. Molekyler som løst i den mobile fasen er for store til å passere gjennom porene, føres med mobilfasen mellom partiklene og elueres ut før molekyler som passerer gjennom porene. Når molekylmassen øker, får man altså mindre retensjon og kortere elueringstid [98].

Søylen som ble benyttet til gelfiltrering var en bruksklar, ferdigpakket søyle av typen Superdex<sup>TM</sup> 200 HR 10/30. Betegnelsen 10/30 beskriver søylens dimensjonen hvor 10 viser til at indre diameter er 10 mm og 30 viser til at høyden med pakket materiale er omtrent 30 cm. Superdex 200 produseres ved at dekstran bindes kovalent til kryssbundet porøse agarosepartikler. Denne søylen gir god separasjon av proteiner og peptider med molekylvekt fra 10 000 - 600 000. For gelfiltreringen ble det benyttet et HPLC-instrument.

I dette forsøket ble gelfiltrering benyttet for å fjerne eventuelle immunkomplekser som kunne ha blitt dannet og dermed virket forstyrrende på separasjon på protein A søyle. Retensjonstiden for antistoffmolekylene var kjent fra tidligere undersøkelser ved Folkehelseinstituttet.

### **Praktisk utførelse**

Gelfiltrering ble benyttet som en del av forsøket på å oppnå best mulig separasjon av plasmaprøvene og ble utført i kombinasjon med protein A kromatografi.

### ***Utstyr og reagenser***

- Amicon<sup>®</sup> Ultra-15
- Sentrifuge
- Superdex<sup>™</sup> 200 HR 10/30
- HPLC-instrument fra LKB
- Filter, 0,45 µm
- Sprøyte

Reagenser, se vedlegg 1.

### ***Forberedelse av prøver***

Prøven som her ble benyttet var NaAcetat-fraksjonen, pH 4.0 fra protein A kromatografi.

Først ble denne fraksjonen kjørt analytisk på gelfiltreringssøylen. Dette ble gjort på samme måte som beskrevet nedenfor, men et mye mindre volum av prøven ble påsatt. Til denne prosessen ble 10 µL av NaAcetat-fraksjonen analysert. Dette ble gjort for å se på renhet av eluatet, om antistoffmolekylene var intakte og for å se omtrent hvor mye stoff som var i prøven.

NaAcetat-fraksjonen var i et volum på omtrent 10 mL og måtte oppkonsentreres før den kunne kjøres preparativt på søylen. Oppkonsentrering ble utført ved hjelp av Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 centrifugal filter devices. Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 består av en beholder med en filtreringsenhet som kan benyttes for rask oppkonsentrering. Filtreringsenheten inneholder en Millipore membran som løsninger filtreres over og membranen holder tilbake proteiner inntil en

bestemt molekylvekt og oppkonsentrerer dermed disse. Det finnes filtreringsenheter med ulike membraner slik at proteiner med forskjellig molekylvekt kan oppkonsentreres. Selve filtreringen foregår ved at beholderen med filtreringsenheten sentrifugeres som beskrevet i bruksanvisningen. Tiden for sentrifugering avhenger av volum man ønsker filtrert og hvilken membran som er i filtreringsenheten. Sentrifugalkraften gir da en filtrering over membranen. Etter sentrifugering vil det alltid være igjen minimum 200  $\mu\text{L}$  av konsentratet i filtreringsenheten slik at denne ikke går tørr. Dersom man ønsker et større volum kan sentrifugeringen avbrytes på et tidligere tidspunkt [100]. For denne oppkonsentreringen ble det benyttet en filtreringsenhet med en membran hvor proteiner med molekylvekt over 30 000 ble holdt tilbake. For dette ble oppkonsentreringen ble filtreringsenheten sentrifugert inntil det var omtrent 600  $\mu\text{L}$  igjen i filtreringsenheten.

### ***Forberedelse av systemet***

Før analysering av prøven må instrumentet klargjøres. Eventuell luft i systemet må fjernes før søylen kobles til. Dette gjøres ved å skylle gjennom med elueringsvæsken. Søylen kobles deretter til og etter skylling med elueringsvæsken var denne klar til bruk.

Superdex søylen som ble benyttet i dette tilfellet var tidligere kalibrert med proteiner med kjent molekylvekt ved Folkehelseinstituttet slik at tidspunktet for eluering av IgG var kjent.

### ***Rensing***

Rensingen av NaActetat-fraksjonen ble utført preparativt. Omtrent 500  $\mu\text{L}$  av den oppkonsentrerte prøven ble injisert ved hjelp av loopinjektoren og systemet ble startet. Som elueringsvæske ble Tris/HCl buffer med EDTA benyttet. Det ble samlet fraksjoner på 1 mL.

Når ønskede antistoffer fra prøven var eluert fra søylen ble samlingen av eluat stoppet. Elueringen ble fortsatt inntil de minste molekylene var eluert fra søylen. Søylen var da regenerert og klar til bruk.

### ***2.4.3 Ionebytterkromatografi***

I ionebytterkromatografi benyttes et ionebyttermateriale som stasjonærfase i en kolonne. Som mobilfase benyttes som oftest vandige løsninger. Ionebyttermaterialet består av en uløselig matriks med en kovalent bundet ioniserbar eller ionisk gruppe. Til dette ionet er det knyttet et

motion med motsatt ladning. Motionet kan byttes ut med andre ioner. Stoffer med ioniske eller ioniserbare grupper kan separeres kromatografisk dersom de har forskjellig elektrostatisk tiltrekning til den stasjonære fasen [98]. Ulike proteiner varier i bindingsstyrke med ionebyttermaterialet, og man kan derfor oppnå separasjon. De ulike proteinene elueres ved forskjellig saltkonsentrasjoner avhengig av styrken på ionebindingen.

For denne metoden var det ingen tilgjengelig bruksklar søyle slik at søyle måtte prepareres. Gelen som ble benyttet var Whatman DE-52 som er en cellulosebasert gel og en svak anionbytter med DEAE (diethylaminoethyl) sidegrupper.

Ionebytterkromatografi ble benyttet som et forsøk på å oppnå en god separasjon av plasmaprøver. Denne metoden hadde tidligere blitt benyttet i kombinasjon med protein A kromatografi for separasjon av IgG subklasser [101].

### **Praktisk utførelse**

Ionebytterkromatografi ble benyttet som en del av forsøket på å oppnå best mulig separasjon av plasmaprøvene og ble utført i kombinasjon med protein A kromatografi.

### ***Utstyr og reagenser***

- Glassøyle
- Glassvatt
- DE-52
- Spectra/Por<sup>®</sup> 4
- Sprøyter, 5 mL
- Filter, 0,45 µm
- LC-instrument, GradiFrac-system fra Pharmacia
- Reagensrør, 10 mL
- Amicon<sup>®</sup> Ultra-15
- Sentrifuge

Reagenser, se vedlegg 1.

***Forberedelse av prøven***

Prøven ble først filtrert gjennom et 0,45 µm for å fjerne eventuelt utfelt fibrin. Før prøven kunne renses på ionebytterkromatografi måtte den dialyseres mot første elueringsvæske. Dette ble gjort for at prøven skulle få samme pH og ionestyrke som denne.

Separasjonen foregår som nevnt på grunnlag av proteiners elektriske ladning. Denne avhenger av pH og ionestyrke i prøveløsningen. I praksis betyr dette at dersom prøveløsningen har annen pH og ionestyrke enn elueringsvæsken, kan man risikere at proteiner som ikke hadde bundet seg ved lik pH og ionestyrke likevel bindes til resinet og omvendt.

Dialysering foregikk ved å benytte Spectra/Por<sup>®</sup> 4. Dette er en cellulosemembran som lar molekyler med molekylvekt inntil 12 000 – 14 000 passere gjennom membranen. Dette er ikke en absolutt grense da molekylets form også er av betydning. Dialyseslangen ble fuktet i bufferen og prøveløsningen overført til dialyseslangen og lukket igjen. Slangen ble deretter lagt i et kar med 1 L buffer og dialysert i 1 time før dialysevæsken ble skiftet ut med ny og dialyseringen fortsatte i ytterligere 1 time [102]. Etter endt dialysering var prøven klar til rensing på ionebyttersøylen.

***Preparering av søylematerialet***

Ionebyttermaterialet måtte svelles og ekvilibrerer mot elueringsvæske før bruk. Ekvilibrering foregår ved at omtrent 1L gel først skylles med omtrent 1L 0,5M HCl, deretter med omtrent 5L vann, så med 1L 0,5M NaOH, deretter med 5L vann igjen, etterfulgt av 1L 0,3M fosfatbuffer pH 7,6 for deretter å bli skylt med så mye 0,015M fosfatbuffer pH 7,6 at pH og ionestyrke på skyllevannet tilsvarende bufferen. Dette var allerede utført og ionebyttermaterialet var klar til pakking av søylen.

I bunnen av søylen ble det lagt litt glassvatt fuktet med elueringsvæske for å hindre at partiklene rant tvers gjennom. Ionebyttermaterialet ble deretter helt på søylen og overskudd av bufferen som resinet ble oppbevart i ble eluert. Det ble fylt på med ionebyttermateriale til det var tilstrekkelig mengde i søylen og gelen var godt nok pakket. Bufferen ble deretter eluert slik at overflaten av materialet ble tørr.

***Forberedelse av instrumentet***

Før prøven kunne appliseres på instrumentet måtte det kontrolleres at det ikke var luft i systemet (slinger og detektor). Dette ble gjort ved å skylle gjennom systemet med destillert vann til all luft var fjernet. Deretter ble vannet i systemet erstattet med den første elueringsvæsken. Fraksjonssamlere ble fylt opp med reagensrør og skriveren innstilt etter behov for papirhastighet og sensitivitet.

***Rensing***

Prøven ble applisert på søylen og eluert ned i gelen ved hjelp av tyngdekraften. Søylen ble deretter koblet sammen med instrumentet og systemet startet. Elueringsvæske var 0,015 M K/Na fosfatbuffer pH 7,6.

IgG skal ved denne pH og ionestyrke ikke feste seg til stasjonærfasen og ble dermed eluert sammen med 0,015 M K/Na fosfatbuffer pH 7,6. Det var derfor ikke nødvendig å eluere med andre saltkonsentrasjoner i denne renseprosessen. For å kunne bruke ionebyttermaterialet om igjen må gelen regenereres. Det gjøres ved å utføre ekvilibreringsprosessen som nevnt over.

Under hele elueringsprosessen ble det samlet fraksjoner på 2 mL. Fra skriverintegratoren kunne man bestemme hvilke fraksjoner som inneholdt antistoff. Disse fraksjonene ble samlet og oppkonsentrert som beskrevet under punkt 2.4.2.

Dette konsentratet ble deretter benyttet til videre rensing på protein A.

## 3 RESULTATER

### 3.1 Kvalitetssikring

Kontrollene i ELISA-analysene ble benyttet for å kvalitetssikre analysemetodene. Det ble benyttet positiv og negativ kontroll og kontroll på spesifikke antistoffer. I tillegg ble analyse av alle prøvene utført i duplikater for å kontrollere forekomsten av tilfeldige feil. Det ble også tilstrebet at absorbansen for standarden skulle være likest mulig ved avlesningstidspunktet slik at ikke resultatene skulle bli forskjellige på grunn av ulik reaksjonstid med substratet.

#### 3.1.1 Positiv kontroll

Positiv kontroll ble benyttet for å undersøke reproduserbarheten av analysene slik at resultatene fra ulike oppsett kunne sammenlignes. Resultatene for den positive kontrollen er gjengitt i tabell 3.1.

**Tabell 3.1 Resultater fra positiv kontroll**

Tabellen viser resultatene for den positive kontrollen. Gjennomsnitt og standardavvik er beregnet for kontrollresultater fra samme type analyser.

	Total IgG		IgG1		IgG3	
Stamme	44/76	NZ 98/254	44/76	NZ 98/254	44/76	NZ 98/254
Kvantitering	83 µg/mL±7	62 AU±8	52 µg/mL±5	37 AU±5	17 µg/mL±2	4 AU±0,5
Aviditet	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1

#### 3.1.2 Negativ kontroll

Negativ kontroll ble benyttet i kvantiteringen av antistoff for å kontrollere at det ikke var uspesifikk binding mellom coat og reagensene. Den negative kontrollen ble også benyttet som en indikator på hvilken respons en kjent negativ prøve gir slik at negative prøver kunne identifiseres. Resultatene for den negative kontrollen er gjengitt i tabell 3.2

**Tabell 3.2 Resultater fra negativ kontroll**

Tabellen viser resultatene for den positive kontrollen. For samme type analyser er gjennomsnitt og standardavvik beregnet og disse tallene er gjengitt i tabellen.

Stamme	Total IgG		IgG1		IgG3	
	44/76	NZ 98/254	44/76	NZ 98/254	44/76	NZ 98/254
Kvantitering	0,5µg/mL±0,1	0,6AU±0,1	0,3µg/mL±0,1	0,2AU±0,1	0,0µg/mL	0,1AU±0,1

## 3.2 Kvantitering av IgG antistoffer i serum

Ved å måle antistoffnivåene kan man se vaksinsens effekt på antistoffresponsen. Resultatene fra kvantitering mot OMV 44/76 ble bestemt i µg/mL mens det for kvantitering mot OMV NZ 98/254 ble bestemt i arbitrære enheter (AU) hvor 1 AU sannsynligvis vil tilsvare ca. µg/mL. Dette ble gjort fordi konsentrasjonen i standarden som ble benyttet ikke var bestemt mot OMV NZ 98/254. Kvantitative resultater av IgG mot OMV 44/76 kan altså ikke sammenlignes direkte mot resultater fra IgG mot OMV NZ 98/254.

### 3.2.1 Kvantitering av total IgG

Nivået av total IgG i serum ble bestemt for alle 10 forsøkspersoner for de utvalgte prøvetakingstidspunktene mot OMV fra både 44/76 og NZ 98/254.

#### Total IgG respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Ved start (uke 0) varierte konsentrasjonen av total IgG fra 0,5 µg/mL til 3,0 µg/mL (median 1,3 µg/mL).

Etter første vaksinasjon (uke 2) økte konsentrasjonen av IgG for alle forsøkspersonene. For 7 personer var det en betydelig økning, mens det for de 3 siste var en mindre økning. Nivået varierte fra 4,5 µg/mL til 36,7 µg/mL (median 11,0 µg/mL). Medianen økte med 9,7 µg/mL fra start til uke 2.

Ved uke 6 hadde konsentrasjonen av IgG sunket betraktelig for 4 av forsøkspersonene, men nivået lå fortsatt over konsentrasjonen før vaksinasjon. For 3 av forsøkspersonene hadde konsentrasjonen fortsatt å øke. For de resterende forsøkspersonene var konsentrasjonen omtrent uendret fra uke 2. Ved måling av konsentrasjon av IgG ved uke 6 varierte nivåene fra

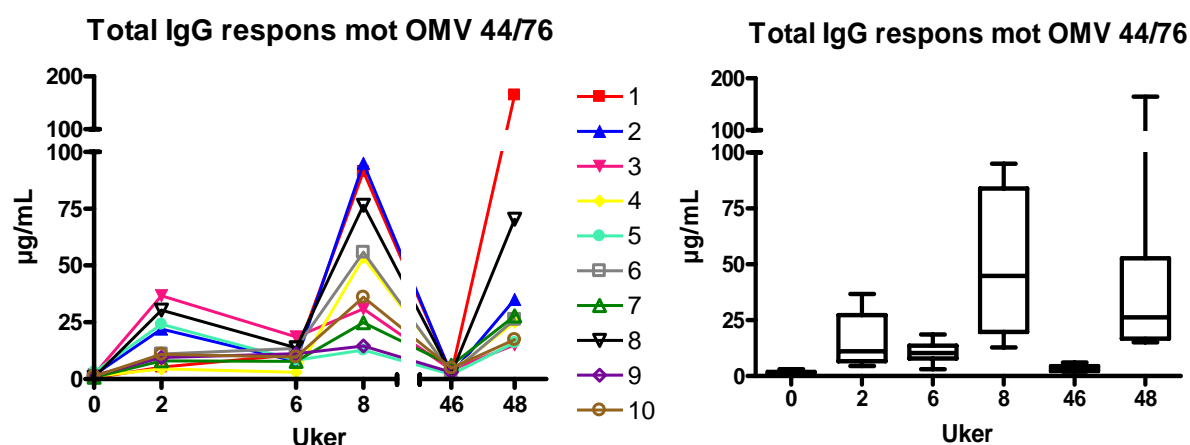


3,1  $\mu\text{g/mL}$  til 18,6  $\mu\text{g/mL}$  (median 10,3  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen ble redusert med 0,7  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 2 til uke 6.

2 uker etter 2.vaksinasjon (uke 8) økte konsentrasjonen av IgG igjen betraktelig for 8 av 10 forsøkspersoner. For de 2 siste forsøkspersonene hadde også nivået av IgG økt, men ikke i like stor grad. 2 av forsøkspersonene hadde lavere nivåer av IgG enn de hadde 2 uker etter 1.vaksinasjon (uke 2). Nivået for uke 8 varierte fra 12,8  $\mu\text{g/mL}$  til 95,0  $\mu\text{g/mL}$  (median 44,8  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen økte med 33,9  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 6 til uke 8.

Ved 3.vaksinasjon (uke 46) hadde nivået sunket betraktelig for alle forsøkspersonene, men 9 av 10 hadde fortsatt konsentrasjoner av IgG høyere enn før 1.vaksinasjon. Nivåene varierte fra 2,0  $\mu\text{g/mL}$  til 6,0  $\mu\text{g/mL}$  (median 2,8  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen ble redusert med 42,0  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 8 til uke 46.

Den 3.vaksinasjonen ble etterfulgt av markant økning av konsentrasjon av IgG for alle forsøkspersonene (uke 48), men kun 3 av forsøkspersonene hadde høyere nivå av IgG enn etter 2.vaksinasjon (uke 8). Resten av forsøkspersonene hadde noe lavere eller omtrent like konsentrasjoner av IgG ved disse to tidspunktene. Nivået varierte fra 15,0  $\mu\text{g/mL}$  til 164,4  $\mu\text{g/mL}$  (median = 26,3  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen økte med 23,5  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 46 til uke 48.



**Figur 3.1** Total IgG respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

**Total IgG respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Kvantitering av total IgG mot OMV NZ 98/254 viste omtrent samme mønster i økning og reduksjon av serumnivåer som mot OMV 44/76, men responsen var generelt lavere og endring av antistoffnivå mellom vaksinedosene var stort sett mindre.

Ved start (uke 0) varierte nivået av IgG fra 0,4 AU til 2,5 AU (median 1,6 AU).

2 uker etter 1.vaksinasjon (uke 2) hadde nivået av IgG økt for alle forsøkspersonene unntatt 1 som fortsatt hadde omtrent likt nivå som ved start. Nivåene varierte fra 1,4 AU til 45,9 AU (median 13,9 AU). Medianen økte med 12,3 AU fra start til uke 2.

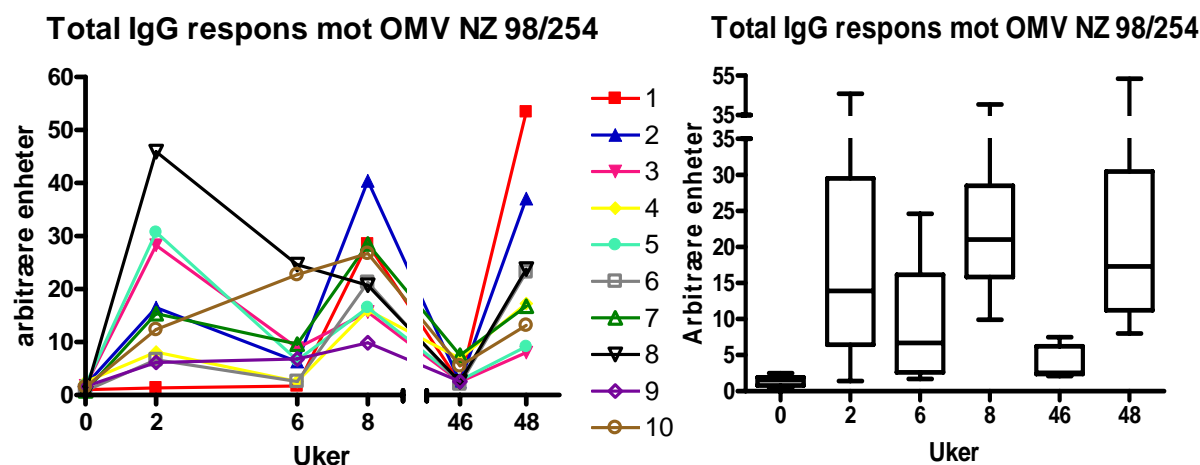
Ved 2.vaksinasjon (uke 6) hadde nivået sunket betraktelig for 7 av 10 forsøkspersoner. For 1 av forsøkspersonene hadde nivået økt ytterligere. For de 2 siste forsøkspersonene lå nivået omtrent likt som ved uke 2. Disse 2 var blant de 3 hvor nivået hadde steget til uke 6 mot OMV 44/76. Alle forsøkspersonene hadde høyere nivåer enn før 1.vaksinasjon. Ved uke 6 varierte nivået fra 1,7 AU til 24,6 AU (median 6,7 AU). Medianen ble redusert med 7,2 AU fra uke 2 til uke 8.

2 uker etter 2.vaksinasjon (uke 8) steg nivået igjen for 9 av forsøkspersonene. Økningen var jevnere for alle forsøkspersonene og ikke så kraftig som responsen mot OMV 44/76. Den siste deltakeren hadde også redusert nivået fra uke 2 til 6 og hadde nå sunket ytterligere. I tillegg til denne personen var det også 2 andre deltakere som hadde lavere nivå av IgG ved dette tidspunktet enn etter 1.vaksinering (uke 2). 2 av disse hadde også hatt lavere nivå mot OMV 44/76 ved dette tidspunktet. Nivåene varierte fra 9,9 AU til 40,4 AU (median 21,0 AU). Medianen økte med 14,3 AU fra uke 6 til uke 8.

Ved uke 46 hadde nivåene for alle forsøkspersonene sunket omtrent ned til samme nivå som ved uke 0, men alle hadde fortsatt høyere konsentrasjon enn ved uke 0. Nivåene varierte fra 2,1 AU til 7,5 AU (median 2,6 AU). Medianen ble redusert med 18,4 AU fra uke 8 til uke 46.

2 uker etter 3.vaksinasjon (uke 48) hadde konsentrasjonen igjen økt betraktelig hos alle forsøkspersonene i forhold til uke 46. 1 av forsøkspersonene hadde betydelig høyere nivå av IgG enn etter 2.vaksinasjon (uke 8), 5 hadde omtrent samme nivå og 4 forsøkspersoner hadde

vesentlig lavere nivåer. Forsøkspersonen som økte betydelig i nivå i forhold til uke 8 var også den som økte mest mot OMV 44/76. Nivåene varierte fra 8 AU til 53,4 AU (median 17,3 AU). Medianen økte med 14,7 AU fra uke 46 til uke 48.



**Figur 3.2** Total IgG respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### 3.2.2 Kvantitering av IgG1

Nivået av IgG1 i serum ble kun bestemt for prøvene tatt 2 uker etter hver vaksinerings (uke 2, 8 og 48). Resultatene fra kvantitering av total IgG i prøvene tatt samtidig med vaksinasjon viste at disse prøvene stort sett hadde så lave konsentrasjoner av IgG at det ikke var interessant å bestemme mengden av IgG1. Serumnivå av IgG1 i de utvalgte prøvene ble bestemt mot OMV fra både 44/76 og NZ 98/254.

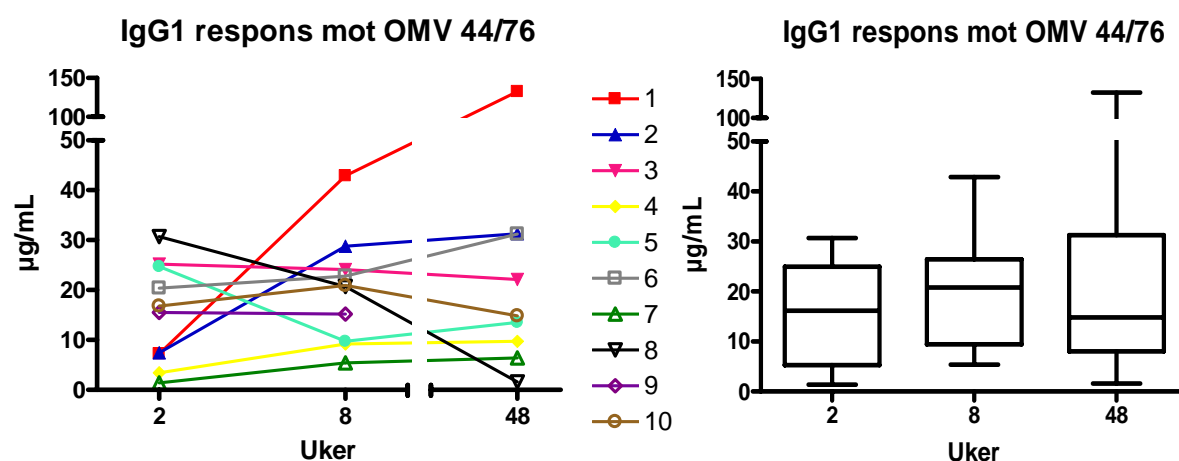
### IgG1 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Etter 1.vaksinasjon (uke 2) varierte nivåene fra 1,4 µg/mL til 30,7 µg/mL (median 16,2 µg/mL).

Ved uke 8 hadde nivået økt i forhold til uke 2 for halvparten av forsøkspersonene. For alle disse økte også nivået av total IgG fra uke 2 til uke 8. For 3 av forsøkspersonene var nivået omtrent likt som ved uke 2. For 2 av disse var også nivået av total IgG omtrent likt ved uke 2

og uke 8, mens det for den siste av disse 3 hadde økt betraktelig. For de 2 siste deltakerne var nivået av IgG1 lavere ved uke 8 enn ved uke 2. Den ene av disse hadde også lavere nivå av total IgG ved uke 8 enn ved uke 2. Nivåene varierte fra 5,4 µg/mL til 42,9 µg/mL (median 20,8 µg/mL). Medianen hadde økt med 4,6 µg/mL fra uke 2 til uke 8.

Etter 3.vaksinasjon (uke 48) hadde 8 av forsøkspersonene omtrent tilsvarende nivå av IgG1 som de hadde ved uke 8. 1 deltaker hadde økt konsentrasjonen av IgG1 betraktelig. Dette var den samme personen som hadde størst økning av total IgG ved uke 48. For den siste forsøkspersonen hadde nivået sunket siden uke 8. Konsentrasjonen varierte fra 1,6 µg/mL til 132,4 µg/mL (median 14,8 µg/mL). Medianen var redusert med 6 µg/mL fra uke 8 til uke 48.



**Figur 3.3** IgG1 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

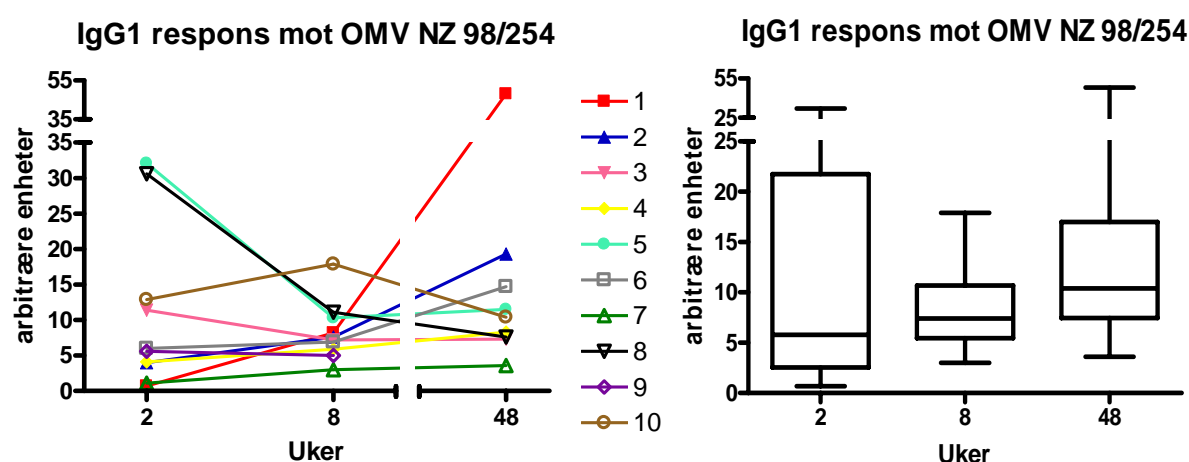
Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### IgG1 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Ved uke 2 varierte nivåene fra 0,7 AU til 32,1 AU (median 5,8 AU).

Etter 2.vaksinasjon (uke 8) var konsentrasjonen av IgG1 noe høyere enn ved uke 2 for 4 av forsøkspersonene. 3 deltakere hadde omtrent samme konsentrasjon som uke 2 og de 3 siste hadde lavere nivåer. Disse 3 hadde også lavere nivå av total IgG ved uke 8 enn ved uke 2. Nivåene varierte fra 3,0 AU til 17,9 AU (median 7,4 AU). Medianen hadde økt med 1,6 AU fra uke 2 til uke 8.

Ved uke 48 hadde 3 av forsøkspersonene høyere verdier av IgG1 enn ved uke 8. 1 av disse hadde også økt nivå av total IgG fra uke 8 til uke 48, mens de 2 andre hadde samme nivå av total IgG. 5 av deltakerne hadde omtrent samme nivå av IgG1 som ved uke 8. 3 av disse hadde heller ikke økt nivået av total IgG fra uke 8 til uke 48 og de 2 andre hadde sunket i nivå av total IgG fra uke 8. De 2 siste deltakerne hadde sunket i konsentrasjon av IgG1 fra uke 8 til uke 48. Den ene av disse hadde også sunket i total IgG, mens den andre hadde samme nivå. Nivåene varierte fra 3,6 AU til 48,1 AU (median 10,4 AU). Medianen hadde økt med 3,0 AU fra uke 8 til 48.



**Figur 3.4** IgG1 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### 3.2.3 Kvantitering av IgG3

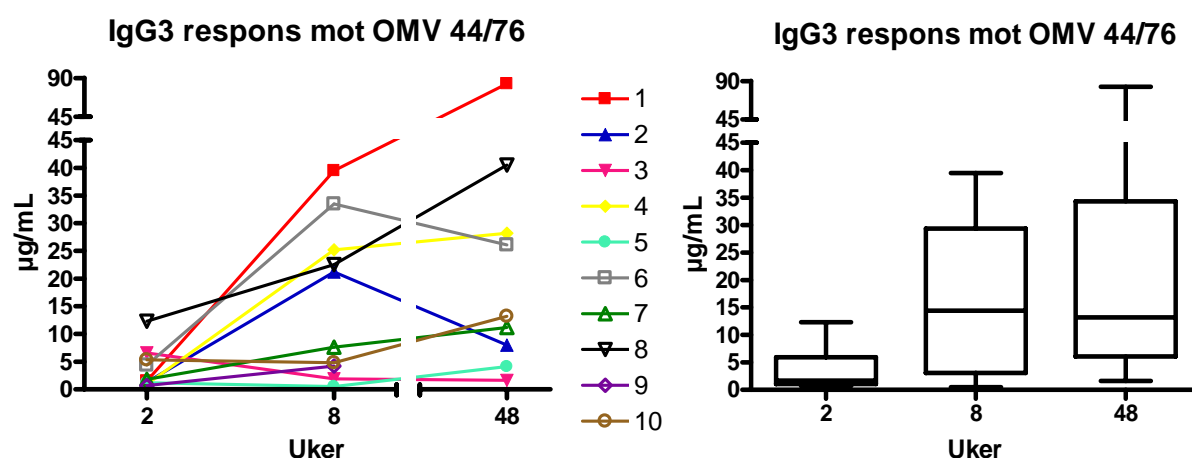
Nivået av IgG3 i serum ble kun bestemt for prøvene tatt 2 uker etter hver vaksinerings (uke 2, 8 og 48). Resultatene fra kvantitering av total IgG i prøvene tatt samtidig med vaksinasjon viste at disse prøvene hadde så lave konsentrasjoner av IgG at det ikke var interessant å bestemme mengden av IgG3. Konsentrasjonen av IgG3 i de utvalgte prøvene ble bestemt mot OMV fra både 44/76 og NZ 98/254.

### IgG3 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Etter 1.vaksinasjon varierte nivået fra 0,7 µg/mL til 12,3 µg/mL (median 1,7 µg/mL).

Ved uke 8 var konsentrasjonen av IgG3 høyere enn ved uke 2 for 7 av forsøkspersonene. 1 hadde lavere nivå og 2 hadde tilsvarende nivå av IgG3 enn ved uke 2. Forsøkspersonen som hadde lavere nivå samt 1 av de 2 med likt nivå hadde også lavere nivå av total IgG ved uke 8 enn ved uke 2. Nivået varierte fra 0,5  $\mu\text{g/mL}$  til 39,5  $\mu\text{g/mL}$  (median 14,4  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen økte med 12,7  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 2 til uke 8.

Etter 3.vaksinasjon hadde kun 2 av forsøkspersonene en stor økning i IgG3 1 av disse hadde også økt mye i total IgG fra uke 8 til 48, mens den andre med stor økning av IgG3 hadde omtrent likt nivå av total IgG ved uke 8 og 48. 3 deltakere hadde en moderat økning. Av disse hadde 2 personer omtrent likt nivå av total IgG ved uke 8 som ved uke 48, mens den siste av dem hadde lavere nivå. 2 deltakere hadde redusert nivået av IgG3 i forhold til uke 8, og disse hadde også lavere konsentrasjon av total IgG ved uke 48 enn ved uke 8. De 3 siste deltakerne hadde omtrent samme nivå av IgG3 ved uke 48 som ved uke 8. En av dem hadde også samme nivå av total IgG ved uke 8 og uke 48, mens de 2 siste hadde lavere konsentrasjon av total IgG. Nivået varierte fra 1,6  $\mu\text{g/mL}$  til 83,3  $\mu\text{g/mL}$  (median 13,2  $\mu\text{g/mL}$ ). Medianen ble redusert med 1,2  $\mu\text{g/mL}$  fra uke 2 til uke 8.



**Figur 3.5** IgG3 respons mot vaksinstammen (OMV 44/76)

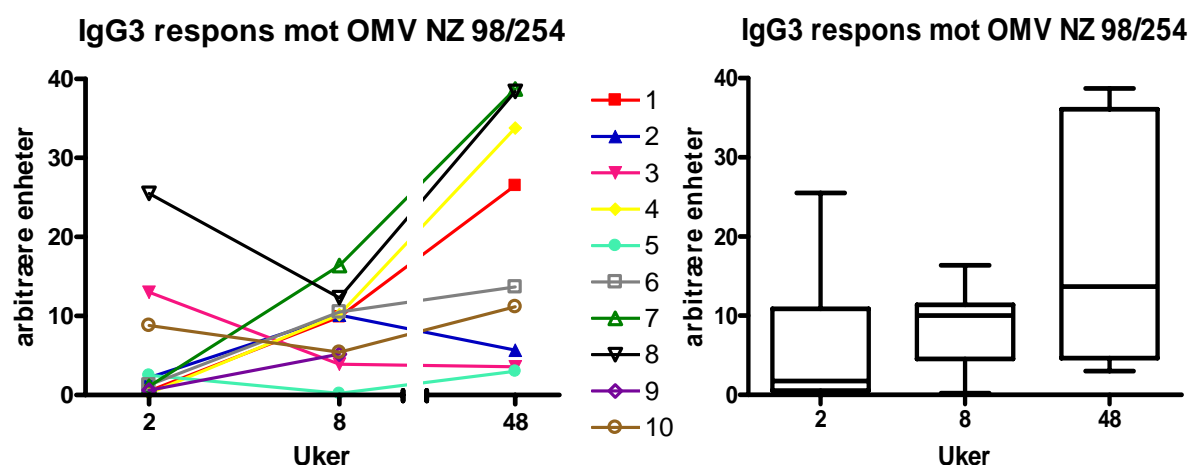
Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### IgG3 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Ved uke 2 varierte nivået fra 0,2 AU til 25,5 AU (median 1,8 AU).

Etter 2.vaksinasjon (uke 8) hadde halvparten av forsøkspersonene høyere nivå av IgG3 enn de hadde etter 1.vaksinasjon. Alle disse hadde også økt i total IgG fra uke 2 til 8. Av de resterende forsøkspersonene hadde 2 lavere nivåer av IgG3 enn etter forrige vaksinasjon, mens de 3 siste hadde omtrent samme nivå. De 2 personene med lavere nivå av IgG3 hadde også lavere nivå av total IgG ved uke 8 enn ved uke 2. Nivået varierte fra 0,2 AU til 16,4 AU (median 10,0 AU). Medianen økte med 8,2 AU fra uke 2 til uke 8.

Ved uke 48 hadde igjen halvparten av forsøkspersonene høyere nivå av IgG3 enn de hadde etter forrige vaksinasjon (uke 8). 3 av disse var blant de som også hadde økt mengde IgG3 ved uke 8 sammenlignet med uke 2. Det var imidlertid bare 1 av de 5 som hadde økt nivå av IgG3 som også hadde økt total IgG fra uke 8 til uke 48. De 4 andre hadde omtrent samme nivå ved uke 48 som ved uke 8. Den siste av deltakerne hadde lavere nivå av IgG3 etter 3.vaksinasjon og denne hadde også lavere nivå av total IgG ved uke 48 enn ved uke 8. Nivået varierte fra 3,0 AU til 38,7 AU (median 13,7 AU). Medianen økte med 3,7 AU fra uke 8 til uke 48.



**Figur 3.6** IgG3 respons mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Diagrammet til venstre viser individuell respons og diagrammet til høyre viser spredningen for forsøkspersonene som gruppe for hvert prøvetakingstidspunkt. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### 3.3 Aviditet av antistoffer i serum og rene fraksjoner

Aviditet gir informasjon om antistoffenes bindingsstyrke og muligens også om vaksins beskyttende effekt. Ved å måle aviditet for hver forsøksperson etter 1., 2. og 3. vaksinasjon

kan man følge utviklingen av bindingsstyrken og se eventuell effekt av flere etterfølgende booster-doser. Sammenligning av aviditet målt i serum og i rene fraksjoner av en subklasse gir også informasjon om eventuell kooperasjon mellom ulike subklasser. Ved å bestemme aviditet mot forskjellige meningokokkstammer får man også informasjon om antistoffenes kryssreaksjon.

4,0 M var høyeste konsentrasjon av thiocyanatløsning benyttet til aviditetstesting. Målingen kan derfor ikke angi aviditet høyere enn dette. Prøver som viste høyere aviditet har derfor fått resultatet >4,0.

6 av forsøkspersonene ble det valgt ut for måling av aviditet for total IgG, IgG1 og IgG3 i serumprøver. Disse ble valgt ut grunnlag av resultatene fra kvantitering av antistoffer. For de utvalgte forsøkspersonene ble prøvene for uke 2, uke 8 og uke 48 testet. Alle prøvene ble testet for aviditet mot OMV fra både 44/76 og NZ 98/254. Forsøkspersonene som ble valgt ut var 1, 2, 4, 6, 7 og 8.

Etter testing av aviditet i serum og på grunnlag av disse resultatene i kombinasjon med resultatene fra kvantitering av antistoffer, ble 4 av forsøkspersonene valgt ut for å isolere IgG1 og IgG3 i fraksjoner. Etter isolering ble prøvene fra uke 2, uke 8 og uke 48 for de 4 forsøkspersonene undersøkt med hensyn på aviditet. Også disse ble testet mot OMV fra både 44/76 og NZ 98/254. Forsøkspersonene som ble valgt ut til dette var 1, 2, 6 og 8.

### **3.3.1 Aviditet av total IgG i serum**

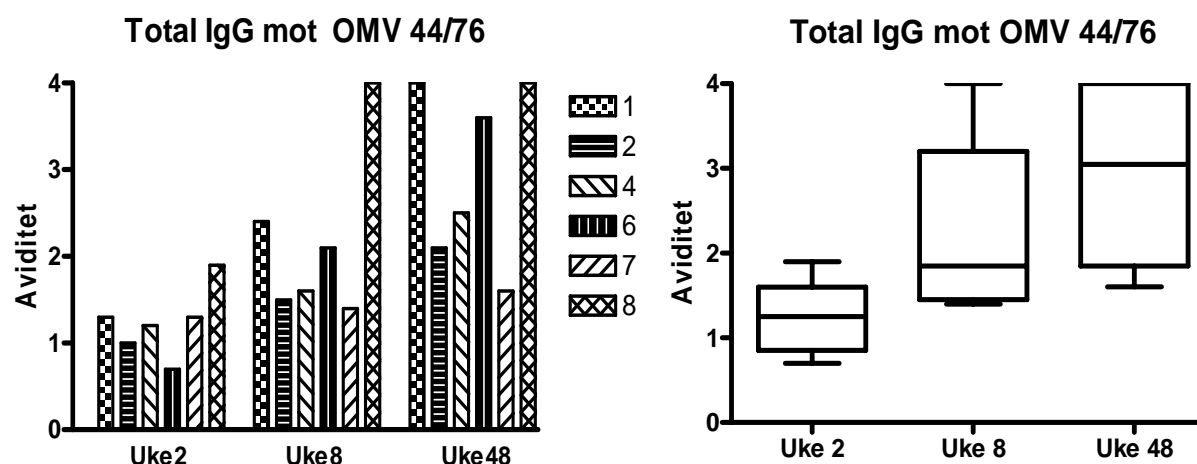
#### **Aviditet av total IgG mot vaksinstammen (OMV 44/76)**

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,7 til 1,9 (median 1,3).

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte fra 1,4 til >4,0 (median 1,9). Dette var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,9.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte fra 1,6 til >4,0 (median 3,1). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,8. Dette var omtrent tilsvarende økningen fra uke 2 til uke 8.





**Figur 3.7 Aviditet av total IgG i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76)**

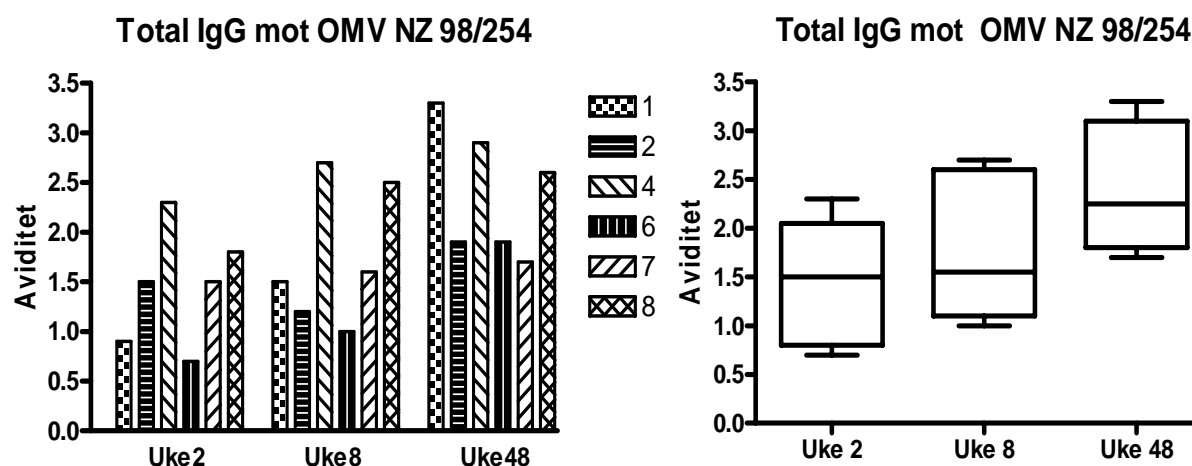
Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### Total IgG mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,7 til 2,3 (median 1,5). Dette var noe høyere enn mot OMV 44/76.

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for 5 av 6 av forsøkspersonene. For den siste personene var aviditeten noe lavere enn ved uke 2. Aviditeten varierte fra 1,0 til 2,7 (median 1,6). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,3 som var en lavere økning enn tilsvarende tidsrom mot OMV 44/76.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for forsøkspersonene som økte fra uke 2 til uke 8. For personen som hadde lavere aviditet ved uke 8 enn uke 2 hadde aviditeten økt slik at nivået nå var høyere enn ved uke 2. Aviditeten varierte fra 1,7 til 3,3 (median 2,3). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,6. Dette var høyere økning enn fra uke 2 til uke 8, men en lavere økning enn tilsvarende tidsrom mot OMV 44/76.



**Figur 3.8 Aviditet av total IgG i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

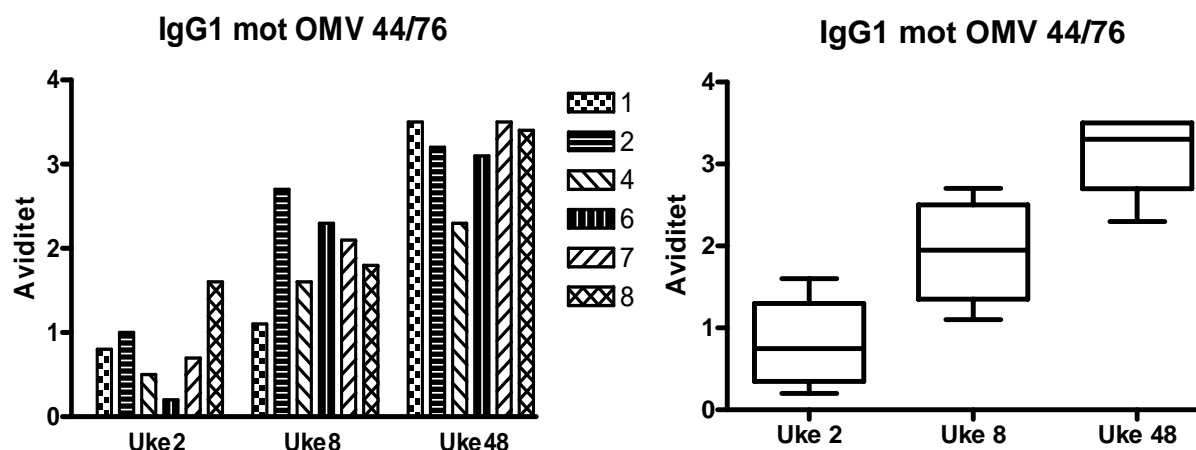
### 3.3.2 Aviditet av IgG1 i serum

#### IgG1 mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,2 til 1,6 (median 0,8).

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 1,1 til 2,7 (median 2,0). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 1,1.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 2,3 til 3,5 (median 3,3). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 1,2. Dette var omtrent tilsvarende økningen fra uke 2 til uke 8.



**Figur 3.9** Aviditet av IgG1 i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76)

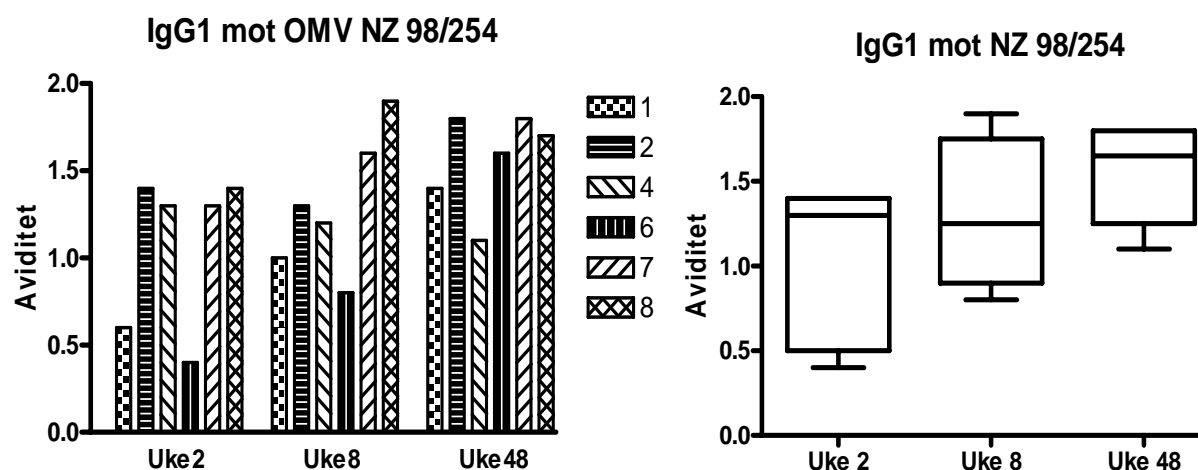
Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### IgG1 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,4 til 1,4 (median 1,3). Dette var høyere enn aviditeten for IgG1 mot OMV 44/76 ved samme tidspunkt.

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for 4 av 6 forsøkspersoner. For de siste personene var aviditeten noe lavere enn ved uke 2. Aviditeten varierte da fra 0,8 til 1,9 (median 1,3). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,2. Dette var en mye lavere økning enn mot OMV 44/76 for tilsvarende tidsrom.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for 3 av forsøkspersonene som økte fra uke 2 til uke 8. Den siste som økte fra uke 2 til 8 hadde nå gått noe ned i aviditet. Av de to som hadde lavere aviditet ved uke 8 enn uke 2 hadde aviditeten økt for en av dem slik at denne personens aviditet nå var høyere enn ved uke 2. For den andre hadde aviditeten gått ytterligere ned. Aviditeten varierte da fra 1,1 til 1,8 (median 1,7). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,3. Dette var omtrent tilsvarende økningen fra uke 2 til uke 8. Også denne økningen var lavere enn økningen mot OMV 44/76.



**Figur 3.10 Aviditet av IgG1 i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

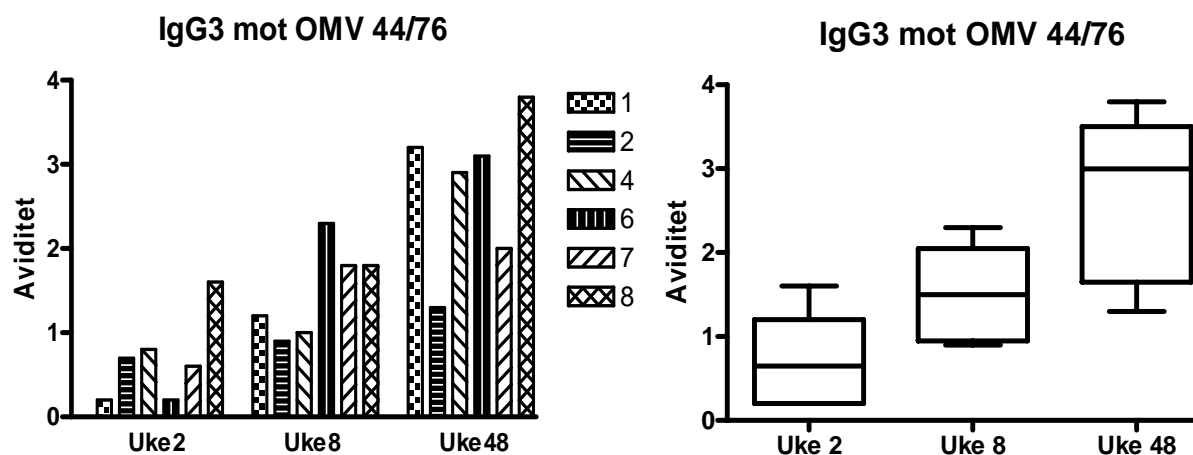
### 3.3.3 Aviditet av IgG3 i serum

#### IgG3 mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,2 til 1,6 (median 0,7).

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 0,9 til 2,5 (median 1,5). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,8.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 1,3 til 3,8 (median 3,0). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 1,2. Dette var en høyere økning i forhold til økningen fra uke 2 til uke 8.



**Figur 3.11 Aviditet av IgG3 i serum mot vaksinstammen (OMV 44/76)**

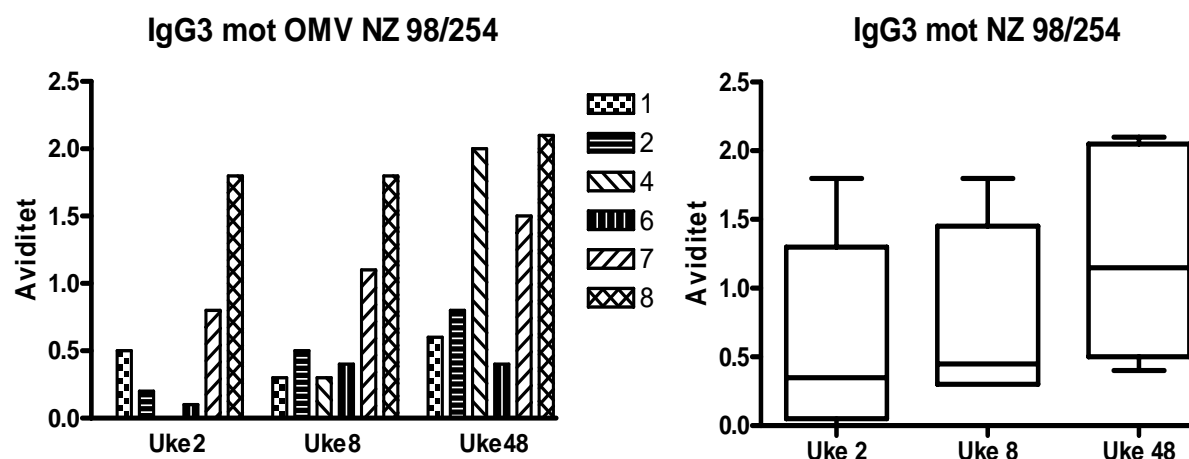
Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### IgG3 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,0 til 1,8 (median 0,4). Dette var lavere enn mot OMV 44/76 ved samme tidspunkt.

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for 4 av 6 av forsøkspersonene. For en av de siste personene var aviditeten noe lavere enn ved uke 2, mens den andre hadde samme aviditet ved uke 8 som ved uke 2. Aviditeten varierte da fra 0,3 til 1,8 (median 0,5). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,2 som var en lavere økning enn mot OMV 44/76.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for 3 av forsøkspersonene som økte fra uke 2 til uke 8. Personen som ikke økte ytterligere hadde lik aviditet som for uke 8. For personen som hadde lavere aviditet ved uke 8 enn uke 2 hadde aviditeten økt slik at nivået nå var høyere enn ved uke 2, mens personene som hadde samme aviditet ved uke 2 og 8 nå hadde økt. Aviditeten varierte fra 0,4 til 2,1 (median 1,2). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,5. Dette var mye høyere økning enn økningen fra uke 2 til uke 8, men likevel lavere enn den tilsvarende økningen mot OMV 44/76.



**Figur 3.12 Aviditet av IgG3 i serum mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

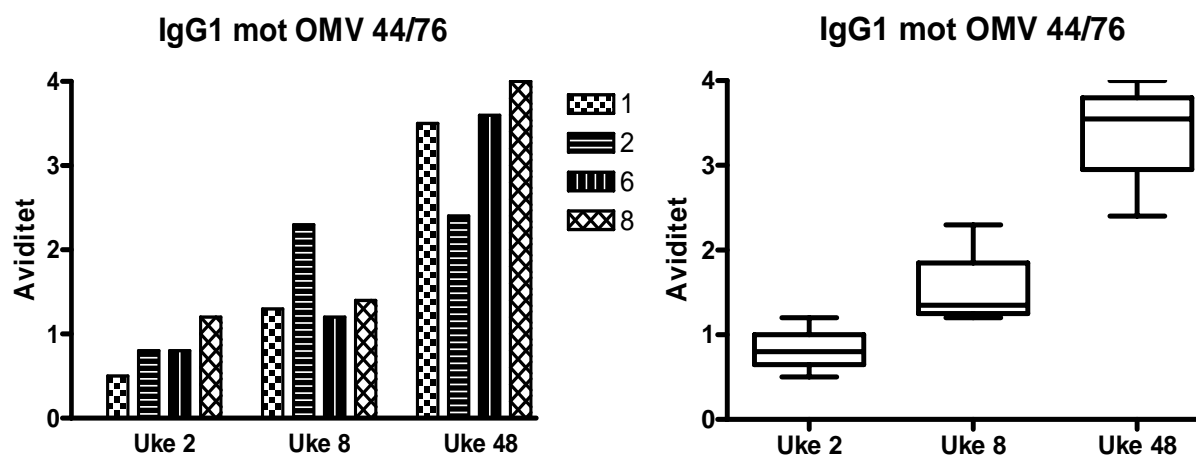
### 3.3.4 Aviditet av renset IgG1

#### IgG1 mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,5 til 1,2 (median 0,8). Dette var omtrent tilsvarende resultater som før separasjon.

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 1,2 til 2,3 (median 1,4). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,7. Dette var noe lavere median og gjennomsnittlig økning i forhold til før separasjon.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte fra 2,4 til 4,0 (median 3,6). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 1,8. Dette var en mye høyere økning enn økningen fra uke 2 til uke 8 og også høyere enn økningen før separasjon.



**Figur 3.13 Aviditet av renset IgG1 mot vaksinstammen (OMV 44/76)**

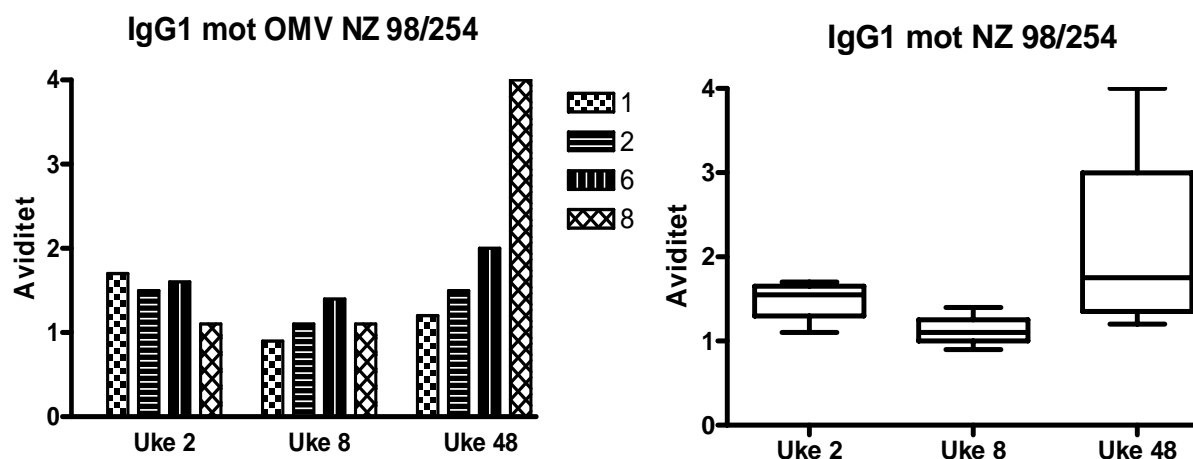
Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### **IgG1 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 1,1 til 1,7 (median 1,6). Dette var noe høyere resultater enn før separasjon.

Ved uke 8 hadde aviditeten gått ned for 3 av forsøkspersonene. For den siste personen var aviditeten for uke 8 samme som uke 2. Aviditeten varierte da fra 0,9 til 1,4 (median 1,1). Det var en gjennomsnittlig reduksjon fra uke 2 på 0,4. Før separasjon hadde aviditeten økt ved dette tidspunktet og medianen var noe høyere.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. 3 av deltakerne hadde nå høyere aviditet enn de hadde ved uke 2. Den siste personen hadde økt slik at aviditeten ved uke 48 var lik uke 2. Aviditeten varierte fra 1,2 til 4,0 (median 1,8). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 1,8. Dette var en mye høyere økning enn før separasjon og medianen var nå omtrent tilsvarende medianen før separasjon.



**Figur 3.14 Aviditet av renset IgG1 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### 3.3.5 Aviditet av renset IgG3

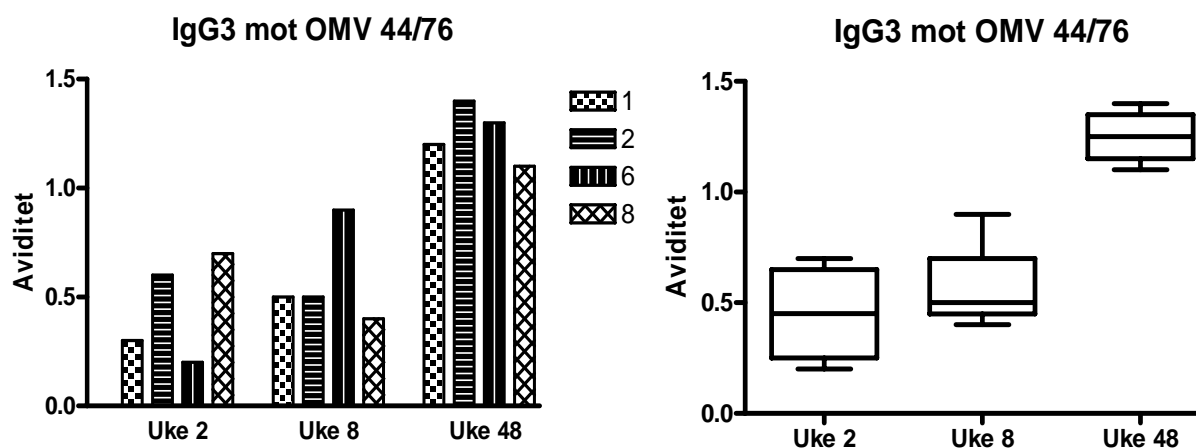
#### IgG3 mot vaksinstammen (OMV 44/76)

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,2 til 0,7 (median 0,5). Dette var omtrent like resultater som før separasjon.

Ved uke 8 hadde aviditeten økt for halvparten av forsøkspersonene mens den andre halvparten hadde lavere aviditet enn ved uke 2. Aviditeten varierte da fra 0,4 til 0,9 (median 0,5). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,1. Dette var mye lavere resultater enn før separasjon.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt for alle forsøkspersonene. De to som hadde redusert nivået fra uke 2 til 8 hadde økt slik at aviditeten nå var høyere enn ved uke 2. Aviditeten varierte fra 1,1 til 1,4 (median 1,3). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,7 som var en lavere økning enn før separasjon. Medianen før separasjon var også mye høyere.





**Figur 3.15 Aviditet av renset IgG3 mot vaksinstammen (OMV 44/76)**

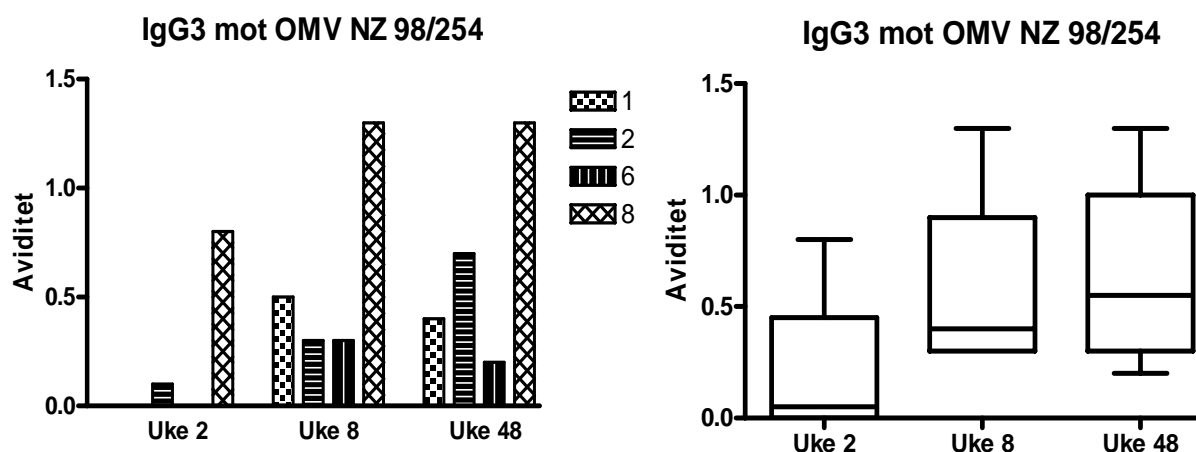
Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

### **IgG3 mot OMV en annen stamme (NZ 98/254)**

Aviditeten målt ved uke 2 varierte fra 0,0 til 0,8 (median 0,1). Også dette var lavere resultater sammenlignet med før separasjon.

Ved uke 8 økte aviditeten for alle forsøkspersonene. Aviditeten varierte da fra 0,3 til 1,3 (median 0,4). Det var en gjennomsnittlig økning fra uke 2 på 0,4. Denne økningen tilsvarte omtrent økningen før separasjon, og økningen i begge tilfellene var meget liten.

Ved uke 48 hadde aviditeten økt ytterligere for kun 1 av forsøkspersonene. For 2 av deltakerne hadde aviditeten sunket noe, men nivået var fortsatt høyere enn ved uke 2. Den siste personen hadde samme aviditet ved uke 48 som ved uke 8. Aviditeten varierte fra 0,2 til 1,3 (median 0,6). Gjennomsnittlig økning fra uke 8 til uke 48 var 0,1 og regnes som uendret. Før separasjon økte aviditeten noe for dette tidsrommet.



**Figur 3.16 Aviditet av renset IgG3 mot en annen stamme (OMV NZ 98/254)**

Figuren til venstre viser aviditetsutviklingen for hver enkelt av forsøkspersonene, mens figuren til høyre viser aviditetsutviklingen for forsøkspersonene som en gruppe. Boksene viser 25 og 75 percentilverdien med en horisontal linje ved medianen. De horisontale merkene viser ytterpunktene i spredningen for hver gruppe.

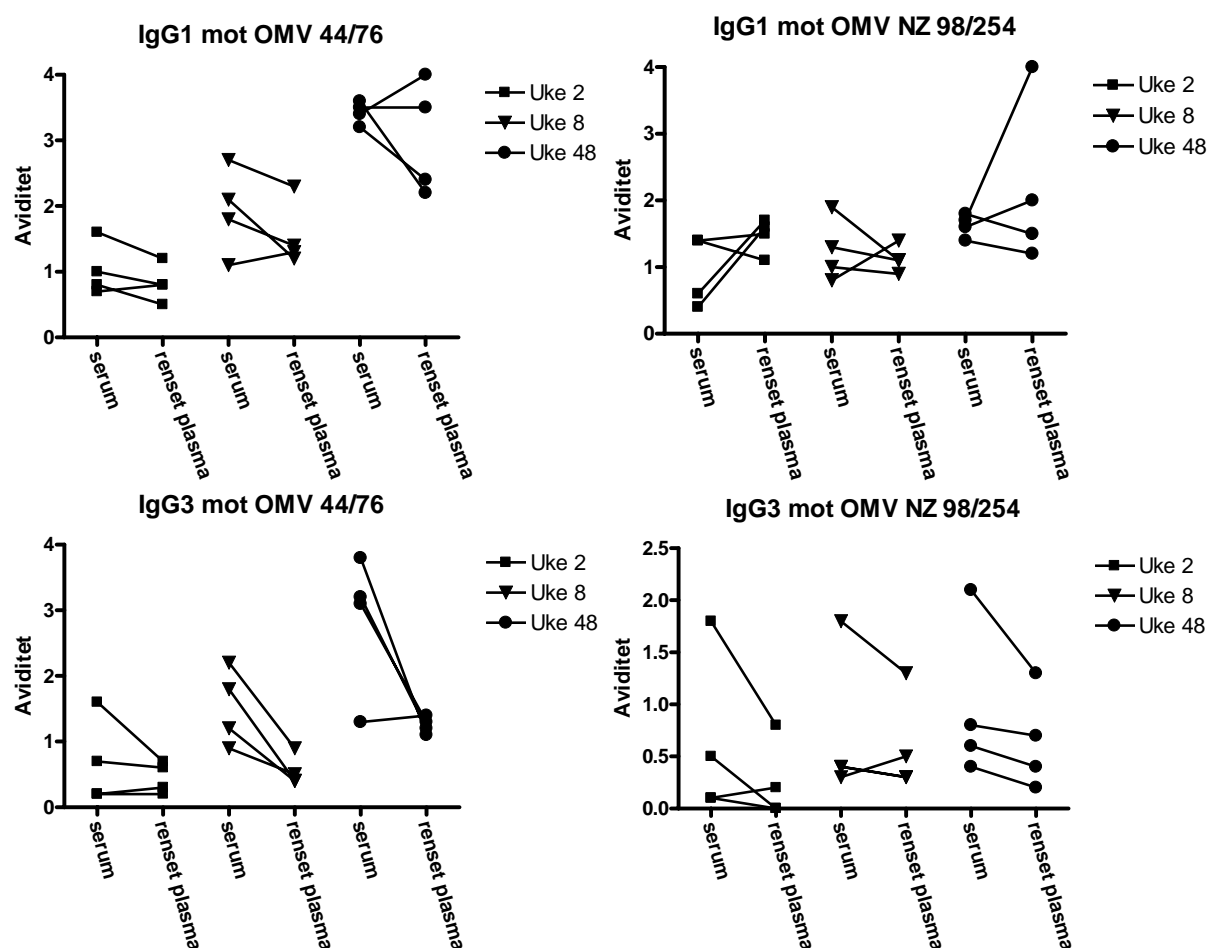
### 3.3.6 Aviditet av IgG1 og IgG3 før og etter isolering

Sammenligning av aviditet i serum og i rene fraksjoner ble utført for å undersøke eventuelle kooperasjoner mellom subklassene i serum. Figuren fremstiller resultatene grafisk og viser at det ikke er lett å finne en generell regel for eventuell kooperasjon.

For aviditet av IgG1 mot OMV 44/76 ved uke 2 har 1 av forsøkspersonene høyest aviditet i ren fraksjon, mens de 3 andre har lavere aviditet i ren fraksjon enn i serum. Ved uke 8 er det også 1 deltaker med høyest aviditet i ren fraksjon, men dette er ikke samme person som ved uke 2. Ved uke 48 er det også 1 person med høyest aviditet i ren fraksjon, og dette er heller ikke en av de med høyest aviditet i ren fraksjon ved uke 2 eller uke 8. Det må også nevnes at selv om at forskjellene i aviditeten i serum og i ren fraksjon varierer noe, er denne forskjellen generelt liten.

For aviditet av IgG1 mot OMV NZ 98/254 opptrer omtrent samme mønster, men med lavere utvikling av aviditet. Også her er det generelt liten forskjell i aviditeten i serum og i ren fraksjon.

De fleste forsøkspersonene har vesentlig lavere aviditet av IgG3 i ren fraksjon enn i serum. Noen har omtrent lik aviditet og et fåtall økte også noe. Dette gjelder for alle tidspunktene både mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254. Som for IgG1 er det også her stort sett forskjellige forsøkspersoner som avviker fra det generelle mønsteret ved de ulike tidspunktene.



**Figur 3.17 Aviditet før og etter isolering av IgG1 og IgG3**

Figuren viser resultatene før og etter isolering for hver enkelt forsøksperson for IgG1 og IgG3 mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254

## 3.4 Isolering av antistoffer

### 3.4.1 Affinitetskromatografi

Det ble benyttet forskjellige varianter av protein A kromatografi som en del av forsøket på å få rene fraksjoner av IgG-subklasser. Disse variantene er vist under i tabell 3.3. Alle

variantene ga rene fraksjoner av IgG3, mens det var forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonene. Det ble valgt ut 2 av prøvene som det fantes tilstrekkelig materiale av for disse forsøkene.

**Tabell 3.3** *Ulike varianter av protein A kromatografi som ble benyttet*

Metode	Elueringsbuffer for IgG3	”Skyllebuffer”	Elueringsbuffer for IgG1
A	PBS/azid 0,02 %	–	Natriumacetat, pH 4.0
B	PBS/azid 0,02 %	Citratfosfatbuffer, pH 6.0	Natriumacetat, pH 4.0
C	PBS/azid 0,02 %	Natriumacetat, pH 5.0	Natriumacetat, pH 4.0
D	PBS/azid 0,02 %	Natriumacetat, pH 4.5	Natriumacetat, pH 4.0

### Metode A

Denne metoden ga sterk forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonen for begge prøvene. Prosentvis forurensing ble ikke bestemt da det er en tidkrevende prosedyre og undersøkelsene for å se om forurensing var tilstede ga store utslag på IgG3 i IgG1-fraksjonen.

### Metode B

Denne metoden ga også sterk forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonen for begge prøvene. Prosentvis forurensing ble heller ikke bestemt for denne metoden da undersøkelsene for å se om forurensing var tilstede også i dette tilfellet ga store utslag på IgG3 i IgG1-fraksjonen.

### Metode C

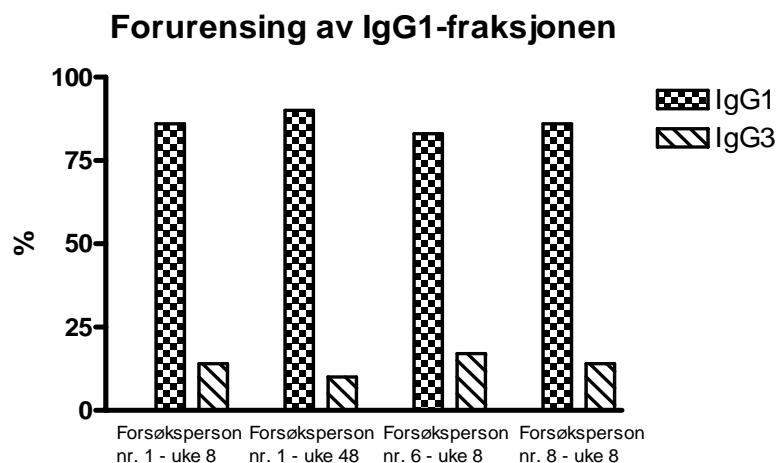
Også denne metoden ga forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonen for begge prøvene. For denne metoden så det ut til at forurensingen var tilstede i mindre grad enn for metode A og B og prosentvis forurensing ble bestemt for å finne ut om det var en akseptabel forurensing for videre undersøkelser. Undersøkelsene viste at den ene prøven inneholdt 86 % IgG1 og 14 % IgG3 mens den andre inneholdt 65 % IgG1 og 35 % IgG3.

### Metode D

Denne metoden ga ingen forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonen for noen av forsøksprøvene. Her ble det benyttet en ”skyllebuffer” med pH tett inntil pH på elueringsbufferen. Man må derfor regne med at en del av ønsket stoff løsnest under skylling og dermed reduserte utbyttet kraftig. De fleste av prøvene inneholdt imidlertid så store mengder antistoff at det likevel var tilstrekkelige mengder igjen etter separasjon.

Denne metoden ble benyttet til å separere plasma fra alle forsøkspersonene da dette var den eneste metoden forsøkt som ga tilsynelatende rene fraksjoner av IgG1 og IgG3.

Etter separasjon av alle prøvene ble det imidlertid oppdaget at 4 av prøvene (1/3) likevel var noe forurenset. For disse prøvene ble prosentvis forurensing av IgG3 bestemt. Den prosentvise forurensingen for prøvene varierte fra 10 – 17 %.



**Figur 3.18 Forurensing av IgG1-fraksjonen**

Figuren viser prosentvis forurensing av IgG3 i IgG1-fraksjonen for de prøvene som fortsatt inneholdt IgG3 etter separasjon. Prøvene som var forurenset var prøvene til forsøksperson 1 fra uke 8 og uke 48 og prøvene fra uke 8 fra forsøksperson 6 og 8.

### 3.4.2 Gelfiltrering

Gelfiltrering ble benyttet underveis i forsøket på å oppnå rene fraksjoner av IgG1 og IgG3 og ble benyttet i kombinasjon med protein A kromatografi, metode C. Prøvene ble først separert på protein A søyle og deretter renset med gelfiltrering. Det var kun eluatet fra natriumacetat pH 4.0 som ble renset ved gelfiltrering ettersom PBS/azid-eluatet allerede var rent med hensyn på IgG3.

Eventuelle immunkomplekser i prøven hadde så høy molekylvekt at de ikke ble retardert i det hele tatt og dermed ble eluert sammen med væskefronten. IgG3 er et større molekyl enn de andre IgG-isotypene, se figur 1.6, og vil derfor ha en noe kortere retensjonstid enn IgG1 selv om begge subklassene blir eluert i samme topp på kromatogrammet. Eluat fra omtrent midt på toppen og den etterfølgende halen ble etter endt eluering samlet for å brukes til videre

analysering. Dette ble gjort for å fjerne eventuelle rester av IgG3 som ikke var separert fra IgG1 under protein A kromatografi.

Denne metoden hjalp betraktelig på renheten av eluatet fra protein A kromatografien. Innholdet av IgG3 etter gelfiltrering for den ene av prøvene var 4 % og for den andre 21 %. Den ene av prøvene ble renere ved å benytte protein A kromatografi, metode C kombinert med gelfiltrering, enn ved å benytte protein A kromatografi, metode D, mens den andre som ble helt ren etter metode D her hadde høyere innhold av IgG3 enn noen av de forurensede prøvene hadde etter metode D.

### ***3.4.3 Ionebytterkromatografi***

Ionebytterkromatografi ble benyttet i kombinasjon med protein A kromatografi underveis i forsøket på å oppnå rene fraksjoner av IgG1 og IgG3. Prøvene ble først rensset på ionebyttersøylen og deretter separert på protein A-søylen, metode C.

Ionebytterkromatografi kombinert med protein A kromatografi, metode C, ga ikke vesentlig renere fraksjoner enn de som ble separert ved protein A kromatografi, metode C alene. Prosentvis forurensing ble ikke bestemt da undersøkelsene for å se om forurensing var tilstede ga store utslag på IgG3 i IgG1-fraksjonen.

## 4 DISKUSJON

Det har i de siste årene blitt utført mye arbeid for å forstå mekanismene bak den beskyttende effekten av den norske OMV vaksinene mot gruppe B meningokokker (MenBvac™). Antistoffer beskytter sannsynligvis mot systemisk meningokokksykdom ved komplement-mediert baktericidal aktivitet og/eller opsonisering av bakterier [103-105]. Effektiviteten av beskyttelsen avhenger blant annet av antistoffenes aviditet og spesifisitet [88]. Det er vist at det hovedsaklig skjer en utvikling av IgG1 og IgG3 etter vaksinerings, hvor IgG1 er det dominerende antistoffet [88, 96]. Det er også vist at antistoffer rettet mot en meningokokkstamme kan kryssreagere med heterologe stammer. Kryssreaktivitet for antistoffer er et ønskelig fenomen og en ideell vaksine er i stand til å indusere antistoffer som binder seg til alle stammer av mikroben [87].

I denne oppgaven har vi undersøkt IgG-responsen med hensyn på IgG1 og IgG3 og aviditet for disse antistoffene i serum etter immunisering med den norske gruppe B meningokokk OMV vaksinen. Vi har også sett på antistoffenes kryssreaksjon mot en annen gruppe B meningokokkstamme (NZ 98/254). IgG1 og IgG3 i form av rene fraksjoner ble også undersøkt med hensyn på aviditet for å undersøke eventuell kooperasjon mellom de to subklassene i serum.

10 forsøkspersoner ble immunisert med 3 doser av vaksinen. De 2 første dosene ble gitt med 6 ukers mellomrom og den 3. dosen 46 uker etter 1. dose. Forsøkspersonene til dette forsøket ble selektert på grunn av lavt nivå av IgG mot OMV 44/76. Dette kriteriet ble valgt for å få deltakere som ikke hadde blitt utsatt for meningokokkantigener i den siste tiden forut for vaksinasjonen og for å få en homogen gruppe med tanke på nivå av IgG antistoffer. Ingen av forsøkspersonene var eller ble bærere av meningokokker i løpet av forsøksperioden.

Alle 10 forsøkspersoner ble undersøkt med hensyn på total IgG, IgG1 og IgG3. Total IgG ble bestemt for alle prøvetidspunktene, mens IgG1 og IgG3 kun ble bestemt for prøvetakingstidspunktene 2 uker etter hver vaksinasjon. Konsentrasjonen av IgG1 og IgG3 ble ikke bestemt ved vaksinasjonstidspunktene fordi konsentrasjonen av total IgG generelt var lav i disse prøvene.

## 4.1 Kvalitetssikring

Resultatene fra den positive og den negative kontrollen hadde generelt lavt standardavvik. Dette viser at variasjonskoeffisienten ved analysene er liten og at metodene som ble benyttet hadde god reproduserbarhet. Dette gjelder både analyse av prøver på samme plate, på forskjellige plater, men i samme oppsett samt for prøver analysert i uavhengige oppsett. At prøvene i tillegg ble analysert i duplikater medvirker til å utelukke at det oppsto tilfeldige feil. Dette viser at resultatene fra samme metode derfor kan sammenlignes selv om de ble analysert på ulike plater og i ulike oppsett.

## 4.2 Antistoffrespons

Utvikling av IgG-antistoffer skjedde allerede etter 1.dose av vaksinen for alle forsøkspersonene. Det var hovedsaklig IgG1 antistoffer som utgjorde økningen av total IgG da kun få av forsøkspersonene utviklet IgG3 etter 1.dose. En enkelt dose av vaksinen medførte altså utvikling av IgG respons hovedsakelig i form av IgG1 antistoffer.

Som forventet sank responsen mot tidspunktet for 2.vaksinasjon. Etter 1. møte med antigen (vaksinasjon) bruker immunresponsen noen dager før produksjonen av antistoffer av IgG type kommer i gang. De fleste av plasmacellene produserer da antistoffer i noen få dager før de dør. Halveringstiden til antistoffmolekylene i serum er mindre enn 3 uker [106, 107]. Det er derfor fortsatt en del antistoff igjen ved dette tidspunktet. Dette stemmer overens med resultatene da alle forsøkspersonene fortsatt hadde konsentrasjoner av antistoff som var høyere enn rett før 1.vaksinasjon.

Etter 2.vaksinasjon økte konsentrasjonen av total IgG ytterligere. Sammenlignet med responsen etter 1.vaksinasjon økte alle forsøkspersonene i nivået av antistoff. En boosterdose av vaksinen økte altså responsen ytterligere i forhold til en enkelt dose.

Fordelingen av IgG1 og IgG3 etter 2.vaksinasjon viste at utviklingen av IgG3 hadde økt i større grad enn utviklingen av IgG1 i forhold til etter 1.vaksinasjon. Konsentrasjonen av IgG1 og IgG3 i prøvene var ved dette tidspunktet omtrent lik. Det kan altså se ut til at en boosterdose ikke hadde noen ytterligere effekt på utviklingen av IgG1-antistoffer, mens IgG3 antistoffene først ble utviklet etter denne dosen. Dette kan bety at det er nødvendig med en



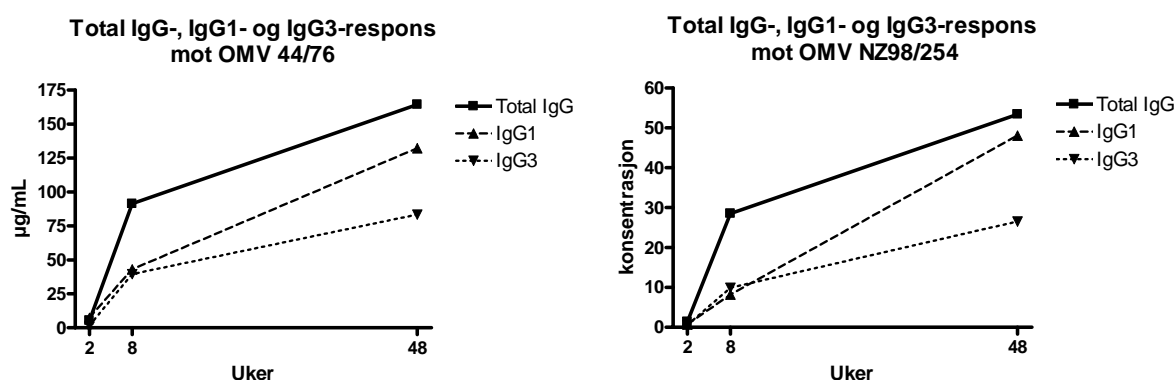
boosterdose for å få utvikling av IgG3-antistoffer, mens utviklingen av IgG1 ikke påvirkes i nevneverdig grad. Denne observasjonen er også gjort tidligere [108].

Ved tidspunktet rett før 3.vaksinasjon hadde konsentrasjonen igjen sunket for alle forsøkspersonene. De fleste deltakerne hadde ved dette tidspunktet et noe høyere nivå av IgG enn de hadde ved starttidspunktet. Ved dette tidspunktet har det gått så lang tid siden forrige dose av vaksinen at man må regne med at antistoffene som ble produsert som følge av vaksinen er forsvunnet [106, 107]. Det er sannsynlig at det er det langlivede plasmacellene som ved dette tidspunktet gjør at det likevel finnes et visst nivå av antistoff i serum [35, 36].

Etter 3.vaksinasjon skjedde det igjen en økning i responsen. For de fleste av forsøkspersonene var imidlertid responsen slik at nivået av antistoffer omtrent tilsvarte nivået etter 2.vaksinasjon. Fordelingen av IgG1 og IgG3 etter 3.vaksinasjon var også omtrent lik fordelingen etter 2.vaksinasjon for de fleste forsøkspersonene. Ut i fra disse resultatene kan det derfor se ut til at en 3.dose av vaksinen ikke har noen ytterligere effekt på utviklingen av antistoff, men kun bringer konsentrasjonen opp til samme nivå som etter 2.dose.

Generelt hadde de fleste av forsøkspersonene lik utvikling av antistoffer. Det var imidlertid en deltaker som utmerket seg med en mye høyere respons av IgG1 og IgG3 enn de andre. Denne personen hadde også tydelig boostereffekt av 3.dose av vaksinen.

Teoretisk sett skal summen av IgG1 og IgG3 bli lik total IgG, men som man kan se av figur 4.1 stemmer ikke alltid dette.



**Figur 4.1 Forholdet mellom total IgG, IgG1 og IgG3**

Diagrammet viser forholdet for forsøksperson 1 mot OMV fra 44/76 og NZ 98/254.

Summen av IgG1 og IgG3 blir i noen tilfeller lavere og i andre tilfeller høyere enn total IgG. Lavere resultater kan skyldes at det også finnes bidrag fra IgG2 og IgG4 selv om de to sistnevnte stort sett bidrar i meget liten grad [96]. En tidligere studie, hvor antistoffer ble kvantitert på tilsvarende måte som i dette forsøket, har vist at variasjonskoeffisienten mellom analyser kan være opptil 20 % [108]. Denne variasjonskoeffisienten kan forklare at total IgG ikke alltid stemmer overens med summen av IgG1 og IgG3.

### **4.3 Affinitetsmodning**

For bestemmelse av aviditet ble det valgt ut 6 av forsøkspersonene som skulle undersøkes. Disse ble valgt på grunnlag av resultatene fra kvantiteringen av total IgG, IgG1 og IgG3. Kriteriet de ble valgt ut i fra var hovedsaklig nivået av antistoffer. Til de videre undersøkelsene var det viktig at prøvene hadde tilstrekkelig med antistoffer og de 6 deltakerne med høyest nivå ble derfor valgt.

Utviklingen av antistoffenes aviditet for total IgG for de ulike forsøkspersonene viste mye jevnere tendenser enn konsentrasjon av antistoffene. Etter 1.vaksinasjon hadde omtrent alle forsøkspersonene en aviditet for total IgG på omtrent 1,0. Dette gjaldt både mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254. En enkelt dose av vaksinen ga altså omtrent lik aviditet mot de to stammene.

Etter 2.vaksinasjon økte aviditeten for alle forsøkspersonene, men i noe varierende grad. Mot OMV NZ 98/254 var det en mindre økning enn mot OMV 44/76. En boosterdose av vaksinen hadde altså en betraktelig effekt på antistoffenes affinitetsmodning både mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254 og gir dermed sannsynligvis økt beskyttelse mot sykdom.

Etter 3.vaksinasjon økte aviditeten ytterligere for alle forsøkspersonene. Mot OMV 44/76 var det igjen en formidabel økning og 2 av deltakerne hadde ved dette tidspunktet oppnådd en aviditet som lå over testsystemets maksimale måleverdi. Mot OMV NZ var det også en tydelig økning, og de fleste forsøkspersonene hadde ved dette tidspunktet oppnådd en aviditet som var høyere enn eller tilsvarte aviditet mot OMV 44/76 etter 2.vaksinasjon. En andre boosterdose hadde altså ytterligere effekt på antistoffenes affinitetsmodning mot både OMV 44/76 og OMV NZ 98/254. Det kan altså se ut til at flere booster doser gir ytterligere økning i

IgG-antistoffenes beskyttelsesevne, i form av affinitetsmodning, selv om dosen i de fleste tilfeller ikke medfører økte nivåer av antistoffer.

Utviklingen av aviditet for IgG1 og IgG3 var mer variert for de ulike forsøkspersonene. Generelt kan man si at det skjedde en tydelig affinitetsmodning av IgG1 og IgG3 mot OMV 44/76 etter hver dose av vaksinene. Det skjedde også en modning for de fleste av forsøkspersonene mot OMV NZ 98/254, men denne modningen var mindre enn mot OMV 44/76. Aviditet for IgG3 var stort sett lavere enn for IgG1, spesielt gjaldt dette aviditet mot OMV NZ 98/254. En del av forsøkspersonene hadde også omtrent lik aviditet for IgG3 som for IgG1 og dette ble oftest sett mot OMV 44/76 selv om det også ble observert mot OMV NZ 98/254. Affinitetsmodning for de ulike subklassene varierte altså fra deltaker til deltaker. Den generelle tendensen var at flere booster doser førte til en betraktelig økning i aviditet for IgG1 og en mer moderat økning i aviditet for IgG3 mot OMV 44/76. Mot OMV NZ 98/254 var det en viss affinitetsmodning for IgG1 mens kun enkelte forsøkspersoner opplevde økt aviditet for IgG3.

Av de analyserte prøvene var det en forsøksperson som utmerket seg spesielt ved å vise høyere aviditet og større affinitetsmodning mot OMV NZ 98/254, altså den ”fremmede” stammen, enn mot OMV 44/76. Dette kan være et tilfelle av heteroklitisk antistoff. Heteroklitiske antistoffer er antistoffer med en sterkere respons mot fremmed antigen. En forutsetning er likevel at antigenet er nært beslektet [109].

Selv om thiocyanatmetoden for måling av aviditet har god reproduserbarhet er det fortsatt noe usikkerhet i resultatene. Tidligere undersøkelser har funnet at resultater fra ulike oppsett har en variasjonskoeffisient på inntil 12,6 % og resultatene fra samme oppsett kan variere inntil 4,1 % [110]. Dette må tas i betraktning når resultatene fra aviditetsanalysene vurderes.

#### ***4.3.1 Aviditet av IgG1 og IgG3 i serum og i rene fraksjoner***

Aviditeten i de tilnærmet rene fraksjonene viste ingen tydelige mønstre. For IgG1 mot OMV 44/76 økte aviditeten etter booster dosene med omtrent samme grad av økning som før separasjon til omtrent samme nivå. Mot OMV NZ 98/254 var det helt andre resultater. Noen av prøvene hadde mye lavere aviditet, noen hadde mye høyere og noen lik aviditet som før separasjon. Det var ikke noe som gjaldt generelt for en forsøksperson, men varierte og så for

de ulike prøvetakingene for hver enkelt. For IgG3 var aviditeten generelt lavere etter separasjon enn før og dette gjaldt både mot OMV 44/76 og mot OMV NZ 98/254. Man kan grovt trekke sammen disse resultatene og si at aviditeten av IgG1 var lik eller høyere rensende fraksjoner sammenlignet med aviditeten i serum, mens den for IgG3 ble redusert etter rensing. Det kan av dette se ut som om tilstedeværelse av IgG1 fremmer bindingsstyrken til IgG3, mens tilstedeværelsen av IgG3 har ingen eller liten effekt på aviditeten for IgG1. For å avgjøre om dette er et reelt funn kreves det flere undersøkelser og av en større populasjon.

Det kan være flere årsaker til at aviditetsmåling etter separasjon gir sprikende resultater. Under separasjon utsettes IgG1 antistoffene for lav pH. Dette kan føre til destabilisering, aggregering, fragmentering eller denaturering. Dersom en eller flere av disse prosessene har foregått vil dette kunne påvirke målt aviditet. På grunn av begrenset tid var det ikke mulig å gjennomføre tester for å undersøke om noen av disse prosessene hadde forekommet. Under separasjonen har også en del av antistoffene gått tapt. Dette gjelder også spesielt IgG1. Det er ikke mulig å vite om antistoffene som har gått tapt var av høy- eller lav-affinitets type, eller om tapet har fordelt seg jevnt mellom de to typene. Avhengig av dette vil målt aviditet kunne påvirkes. En metode for å kontrollere dette vil være å igjen slå sammen fraksjonene av IgG1 og IgG3 og deretter analysere aviditet. Dersom resultatet blir annerledes enn før isolering må man regne med at antistoffene har blitt påvirket av isoleringen og at aviditeten man har målt i de rene fraksjonene muligens ikke er sanne. Dersom resultatet blir tilsvarende som før isolering kan man regne med at metoden gir et riktig bilde av aviditet for de rene fraksjonene. I tillegg bør de rensede antistoffer undersøkes for å se om noen av prosessene nevnt over (destabilisering, aggregering, fragmentering og denaturering) har forekommet.

#### **4.4 Kryssreaksjon**

Konsentrasjonen av antistoff etter kvantitering mot OMV fra de to ulike meningokokkstammene er ikke direkte sammenlignbare. Standardens konsentrasjon mot OMV 44/76 var kjent, mens den mot OMV NZ 98/254 ble satt til en verdi oppgitt i arbitrære enheter (AU). I denne oppgaven ble verdien satt slik at AU korresponderte omtrent med  $\mu\text{g/mL}$ .

Etter 1.vaksinering var det en signifikant økning av konsentrasjon av antistoff for total IgG mot både OMV 44/76 og OMV NZ 98/254. Endringen fra start var omtrent lik mot de to

stammene og man kan dermed anta at det var liten forskjell i responsen mot OMV fra 44/76 og OMV fra NZ 98/254. Også aviditeten var omtrent lik etter 1. dose av vaksinen.

Etter 2. vaksinerings økte nivået av antistoff i større grad mot OMV 44/76 enn mot OMV NZ 98/254. Også affinitetsmodningen var høyere mot OMV 44/76 enn mot OMV NZ 98/254. En boosterdose økte altså responsen mot OMV 44/76 i større grad enn mot OMV NZ 98/254.

Etter 3.vaksinasjon skjedde det igjen en økning i antistoffresponsen. Dette gjaldt både responsen mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254. Aviditeten økte også ytterligere etter denne vaksinedosen mot begge stammene, men også i dette tilfellet i størst grad mot OMV 44/76. Flere boosterdosser gir altså ytterligere økning i responsen både mot OMV 44/76 og OMV NZ 98/254, men også denne dosen ga størst økning mot OMV 44/76.

Fordelingen av IgG1 og IgG3 var tilsvarende for både OMV 44/76 og OMV NZ 98/254, men responsen mot OMV 44/76 var også for subklassene høyere enn mot OMV NZ 98/254. Det viste seg at aviditeten utviklet seg lite for IgG3 mot OMV NZ 98/254, mens utviklingen av aviditet for IgG1 var likere for de to stammene.

Ut i fra disse resultatene ser man tydelig at antistoffene også kryssreagerer med andre meningokokkstammer, men fordi man ikke kan sammenligne de kvantitative resultatene er det vanskelig å si i hvor stor grad kryssreaksjon foregår. Det er likevel tydelig at responsen mot fremmed stamme er lavere enn mot vaksinstammen. Vaksinerings og boosterdosser medfører økt antistoffrespons og affinitetsmodning også mot fremmed stamme og dette kan tyde på at vaksinerings og boosterdosser også øker beskyttelsen mot andre meningokokkstammer enn vaksinstammen. Beskyttelse er som nevnt over også avhengig av andre faktorer og det er usikkert hvor stor klinisk betydning funnene i denne oppgaven har.

## **4.5 Isolering av IgG1 og IgG3**

Til isolering av IgG1 og IgG3 ble 4 av forsøkspersonene valgt ut. Disse ble valgt blant de 6 som var undersøkt med hensyn på aviditet. En ble valgt bort på grunn av lav aviditet og den andre ble valgt bort på grunn av lite tilgjengelig prøvemateriale.

Det ble forsøkt flere forskjellige metoder for å separere IgG1 og IgG3. Flere varianter av protein A kromatografi (se tabell 3.3) ble forsøkt samt protein A kromatografi i kombinasjon med gelfiltrering og ionebytterkromatografi.

2 av variantene av protein A kromatografi, metode A og B, fungerte dårlig og ga IgG1-fraksjon med høyt innhold av IgG3. Metode C fungerte noe bedre, men ga fortsatt ikke fraksjoner med akseptabel renhet.

Tidligere erfaringer med protein A kromatografi ved Folkehelseinstituttet tilsa at metode C skulle fungert og at denne metoden skulle gitt tilstrekkelig rene fraksjoner. Det ble derfor undersøkt om det kunne være andre faktorer som gjorde at IgG1-fraksjonen ikke ble ren. En mulighet var at det kunne ha blitt dannet immunkomplekser som inneholdt både IgG1 og IgG3 i prøvene. Disse kompleksene kunne da, via IgG1 molekylerne, ha bundet seg til protein A søylen og blitt eluert sammen med IgG1. Analyse av denne fraksjonen vil da gi positivt utslag på både IgG1 og IgG3.

Gelfiltrering ble benyttet for å undersøke om det var immunkomplekser i IgG1-fraksjonen. Ved gelfiltrering vil immunkompleksene transporteres med mobilfasen gjennom søyla uten å retarderes, mens mindre molekyler som IgG1 og IgG3 retarderes og elueres ved et senere tidspunkt. IgG1 er også et noe mindre molekyl enn IgG3 og vil derfor retarderes noe mer enn IgG3. Undersøkelse av eluatene etter gelfiltrering viste at det ikke var immunkomplekser i prøvene. Siden forskjellen på IgG1 og IgG3 er liten vil man ikke kunne se et klart skille mellom dem. Tidligere undersøkelser ved Folkehelseinstituttet har vist at IgG3 hovedsakelig elueres i første del av toppen mens IgG1 hovedsakelig elueres i siste delen. Eluatene fra siste delen av IgG1/IgG3-toppen ble derfor samlet og renheten undersøkt for IgG3-forurensing. Analysen viste at renheten hadde bedret seg betraktelig, men fortsatt var den ikke tilfredsstillende. I tillegg var utbyttet lavt da en god del av IgG1 ble eluert i første del av toppen.

Tidligere studier har benyttet seg av ionebytterkromatografi i kombinasjon med protein A kromatografi for rensing av IgG-subklasser [101]. Ved bruk av ionebytterkromatografi før separering på protein A søyle kan man eliminere andre proteiner som kan virke interfererende på protein A kromatografi. Dette ble forsøkt for å oppnå rene fraksjoner av IgG1 og IgG3.

Prøven ble først dialysert før den ble rensset på ionebyttersøyle. Den ble deretter oppkonsentrert og separert på protein A søylen. Kombinasjonen av ionebytterkromatografi og Protein A kromatografi, metode C, ga omtrent samme renhetsgrad i IgG1-fraksjonen som protein A kromatografi, metode C, gjorde alene.

Tilslutt ble protein A kromatografi, metode D, forsøkt for å oppnå rene fraksjoner. Tidligere undersøkelser ved Folkehelseinstituttet har vist at mye IgG1 går tapt ved denne metoden fordi pH på skyllebufferen er nærme pH på elueringsbufferen. De fleste av prøvene inneholdt mye IgG1 og sannsynligvis ville det være nok IgG1 igjen til å gjennomføre senere undersøkelser. Denne metoden ga rene fraksjoner av IgG1 og separasjonsmetoden ble derfor benyttet for separasjon på de utvalgte prøvene. Det viste seg imidlertid at metoden likevel ikke var helt optimal. 4 av de utvalgte prøvene fikk ikke 100 % rene IgG1-fraksjoner. Disse inneholdt fra 10-17 % IgG3 og dette ble vurdert som tilstrekkelig rent for senere undersøkelser.

Hvorfor protein A kromatografi metode A, B og C ikke fungerte er et ubesvart spørsmål. All tidligere erfaring tilsier at det ikke skulle vært noen problemer med disse metodene, og forsøk på å finne litteratur som kunne presentere mulige løsninger har heller ikke lyktes.

## **4.6 Statistiske beregninger**

Det har ikke blitt benyttet statistiske tester i denne oppgaven. Metodene har inntil 20 % variasjonskoeffisient og siden det på grunn av begrenset tid ikke har blitt utført uavhengige paralleller for noen av analysene må det regnes med en viss usikkerhet i resultatene. Det lave antallet forsøkspersoner gjør det også vanskelig å gjennomføre statiske tester. På grunnlag av dette ble det valgt å ikke behandle resultatene statistisk.

## 5 KONKLUSJON

Vaksinasjon med den norske OMV vaksinen mot gruppe B meningokokker ga utvikling av IgG1-antistoffer etter 1 dose, men utvikling av IgG3 generelt krevde 2 eller flere doser. En 3. dose så ikke ut til å gi høyere konsentrasjoner av antistoffer i serum enn konsentrasjoner oppnådd etter 2.dose.

Det så ut til å foregå en affinitetsmodning av både IgG1 og IgG3 etter 1 dose av vaksinen. Flere booster doser så ut til å resultere i betraktelig affinitetsmodning for IgG1 og en mer moderat modning for IgG3 mot vaksinstammen (44/76), mens det for stamme NZ 98/254 hovedsakelig foregikk en affinitetsmodning for IgG1. Affinitetsmodning foregikk selv om konsentrasjonen av IgG i serum ikke økte.

Antistoffene viste tydelig kryssreaksjon med NZ 98/254, men det er vanskelig å avgjøre i hvor stor grad da de kvantitative resultatene ikke kan sammenlignes. Det var likevel tydelig at responsen mot NZ 98/254 var lavere enn mot 44/76. Flere doser av vaksinen resulterte i økt antistoffrespons og affinitetsmodning også mot NZ 98/254 og det kan tyde på at flere doser øker beskyttelsen også mot andre meningokokkstammer, men det er usikkert hvor stor klinisk betydning disse funnene har.

Ut i fra resultatene i denne oppgaven kan se ut som om tilstedeværelse av IgG1 fremmer bindingsstyrken til IgG3 i serum, mens tilstedeværelsen av IgG3 har ingen eller liten effekt på aviditeten for IgG1. Det krever imidlertid flere undersøkelser for å avgjøre om dette er et reelt funn.



---

## 6 LITTERATURLISTE

1. Bøvre K, Tønjum T: *Neisseriaceae og Moraxellaceae*. In: *Medisinsk mikrobiologi*. Edited by Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H, 2 edn. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag; 2000: 104-123.
  2. Tjåde T: **Medisinsk mikrobiologi og infeksjonssykdommer**, 2 edn. Polen: Fagbokforlaget; 2002.
  3. Josephsen JO, Schøyen R: **Mikroorganismer og sykdom**, 7 edn. Norway: Gyldendal Norsk Forlag A/S; 1997.
  4. Hovig B, Lystad A: **Infeksjonssykdommer - epidemiologi, mikrobiologi og smittevern**, 4 edn. Gjøvik: Gyldendal Norske Forlag AS; 2001.
  5. Jennings HJ: **Capsular Polysaccharides as Human Vaccines**. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1983, **41**:155-208.
  6. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT: **Serotype Antigens of Neisseria-Meningitidis and a Proposed Scheme for Designation of Serotypes**. *Reviews of Infectious Diseases* 1985, **7**(4):504-510.
  7. Hitchcock PJ: **Unified Nomenclature for Pathogenic Neisseria Species**. *Clinical Microbiology Reviews* 1989, **2**:S64-S65.
  8. Feavers IM, Maiden MCJ: **A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of Neisseria gonorrhoeae**. *Molecular Microbiology* 1998, **30**(3):647-656.
  9. Ala'Aldeen DA: **Meningococcal vaccines: the challenge and the prospects**. *PHLS Microbiology Digest* 1996, **13**:152-157.
  10. **Smittevernhåndbok for kommunehelsetjenesten 2002-2003**: Folkehelse, Statens institutt for folkehelse; 2001.
  11. Norheim G, Rosenqvist E, Aavitsland P, Caugant DA: **Meningokokksjukdom i Afrika - epidemiologi og forebygging**. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2000, **120**(15):1735-1739.
  12. Kristiansen BE, Tveten Y, Jenkins A: **Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of Neisseria meningitidis? A population based study**. *British Medical Journal* 1998, **317**(7159):621-625.
  13. Holten E, Bratlid D, Bøvre K: **Carriage of Neisseria Meningitidis in a Semi-Isolated Arctic Community**. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1978, **10**(1):36-40.
  14. Davey PG, Cruikshank JK, McManus IC, Mahood B, Snow MH, Geddes AM: **Bacterial-Meningitis - 10 Years Experience**. *Journal of Hygiene* 1982, **88**(3):383-401.
  15. Lystad A, Aasen S: **The epidemiology of meningococcal disease in Norway 1975-91**. *NIPH Ann* 1991, **14**(2):57-65; discussion 65-56.
  16. World Health Organization: **Epidemic meningococcal disease**. Genève: World Health Organization; 1998.
  17. Skrede S, Sjørnsen H, Solberg CO: **Behandling av akutt bakteriell meningitt**. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2001, **121**(28):3306-3309.
  18. **Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2004**; 2004.
-

- 
19. Parham P: **The Immune System**, 2 edn. United States of America: Garland Science; 2005.
  20. Lea T: **Basal og klinisk immunologi - prinsipper og molekylære mekanismer**. Polen: Fagbokforlaget; 2000.
  21. Müller F, Rollag H: **Infeksjonsimmunologi**. In: *Medisinsk mikrobiologi*. Edited by Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H, 2 edn. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2000: 452-471.
  22. Prescott LM, Harley JP, Klein DA: **Microbiology**, 5 edn: McGraw-Hill; 2002.
  23. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E: **Immunsystemet**. In: *Menneskets fysiologi*. 1 edn. Finland: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2001: 359-376.
  24. Underhill DM, Ozinsky A: **Phagocytosis of microbes: Complexity in action**. *Annual Review of Immunology* 2002, **20**:825-852.
  25. Playfair J: **Infection and Immunity**. Great Britain: Oxford University Press; 1995.
  26. Turner MW: **Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system**. *Immunology Today* 1996, **17**(11):532-540.
  27. Morgan BP, Walport MJ: **Complement Deficiency and Disease**. *Immunology Today* 1991, **12**(9):301-306.
  28. Morgan BP: **Complement, Clinical Aspects and Relevance to Disease**. London: Harcourt Brace Jovanovich; 1990.
  29. Bhakdi S, Kuller G, Muhly M, Fromm S, Seibert G, Parrisius J: **Formation of Transmural Complement Pores in Serum-Sensitive Escherichia-Coli**. *Infection and Immunity* 1987, **55**(1):206-210.
  30. Born J, Bhakdi S: **Does Complement Kill Escherichia-Coli by Producing Transmural Pores**. *Immunology* 1986, **59**(1):139-145.
  31. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ: **Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men**. *Human Immunology* 2004, **65**(4):282-290.
  32. Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H: **Medisinsk mikrobiologi**, 2 edn. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2000.
  33. Schooley JC: **Autoradiographic Observations of Plasma Cell Formation**. *Journal of Immunology* 1961, **86**(3):331-&.
  34. Mäkelä O, Nossal GJV: **Autoradiographic Studies on Immune Response .2. DNA Synthesis Amongst Single Antibody-Producing Cells**. *Journal of Experimental Medicine* 1962, **115**(1):231-&.
  35. Smith KGC, Light A, Nossal GJV, Tarlinton DM: **The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response**. *Embo Journal* 1997, **16**(11):2996-3006.
  36. Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G: **In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection**. *Journal of Experimental Medicine* 1998, **187**(6):885-895.
  37. Manz RA, Thiel A, Radbruch A: **Lifetime of plasma cells in the bone marrow**. *Nature* 1997, **388**(6638):133-134.
-

- 
38. Manz RA, Lohning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A: **Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen.** *International Immunology* 1998, **10**(11):1703-1711.
  39. Helmreich E, Eisen HN, Kern M: **Secretion of Antibody by Isolated Lymph Node Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 1961, **236**(2):464-&.
  40. Hibi T, Dosch HM: **Limiting Dilution Analysis of the B-Cell Compartment in Human-Bone Marrow.** *European Journal of Immunology* 1986, **16**(2):139-145.
  41. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R: **B cell memory and the long-lived plasma cell.** *Current Opinion in Immunology* 1999, **11**(2):172-179.
  42. Porter RR: **Structural Studies of Immunoglobulins.** *Science* 1973, **180**(4087):713-716.
  43. Edelman GM: **Structure and Function of Antibodies.** *Scientific American* 1970, **223**(2):34-&.
  44. Schumaker VN, Phillips ML, Hanson DC: **Dynamic Aspects of Antibody Structure.** *Molecular Immunology* 1991, **28**(12):1347-1360.
  45. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL: **The major histocompatibility complex-related Fc-receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan.** *J Exp Med* 2003, **197**(3):315-322.
  46. Tomasi TB, Grey HM: **Structure and Function of Immunoglobulin A.** *Progress in Allergy* 1972, **16**:81-&.
  47. Brandtzaeg P, Bækkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen FE, Nilsen EM, Yamanaka T: **Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?** *Immunology Today* 1999, **20**(3):141-151.
  48. Venkitaraman AR, Williams GT, Dariavach P, Neuberger MS: **The B-Cell Antigen Receptor of the 5 Immunoglobulin Classes.** *Nature* 1991, **352**(6338):777-781.
  49. Dupasquier L, Wabl MR: **Antibody Diversity in Amphibians - Inheritance of Isoelectric-Focusing Antibody Patterns in Isogenic Frogs.** *European Journal of Immunology* 1978, **8**(6):428-433.
  50. Yu P, Koscovilbois M, Richards M, Kohler G, Lamers MC: **Negative Feedback-Regulation of Ige Synthesis by Murine Cd23.** *Nature* 1994, **369**(6483):753-756.
  51. Heyman B: **IgE-mediated enhancement of antibody responses: the beneficial function of IgE?** *Allergy* 2002, **57**(7):577-585.
  52. Ross SC, Rosenthal PJ, Berberich HM, Densen P: **Killing of Neisseria-Meningitidis by Human-Neutrophils - Implications for Normal and Complement-Deficient Individuals.** *Journal of Infectious Diseases* 1987, **155**(6):1266-1275.
  53. Burton DR, Woof JM: **Human antibody effector function.** *Adv Immunol* 1992, **51**:1-84.
  54. Aase A, Michaelsen TE: **Opsonophagocytic Activity-Induced by Chimeric Antibodies of the 4 Human-Igg Subclasses with or without Help from Complement.** *Scandinavian Journal of Immunology* 1994, **39**(6):581-587.
  55. French M: **Serum Igg Subclasses in Normal Adults.** *Monographs in Allergy* 1986, **19**:100-107.
  56. Morell A, Skvaril F, Hitzig WH, Barandun S: **Igg Subclasses - Development of Serum Concentrations in Normal Infants and Children.** *Journal of Pediatrics* 1972, **80**(6):960-&.
-

- 
57. Oxelius VA: **Igg Subclass Levels in Infancy and Childhood.** *Acta Paediatrica Scandinavica* 1979, **68**(1):23-27.
  58. Hammarström L, Smith CI: **Subclass restriction of IgG antibody responses.** In: *Shakib*. London: Pergamon Press; 1990: 301-312.
  59. Hammarström L, Smith CI: **IgG subclasses in bacterial infections.** *Monogr Allergy* 1986, **19**:122-133.
  60. Rautonen N, Pelkonen J, Sipinen S, Kayhty H, Makela O: **Isotype concentrations of human antibodies to group A meningococcal polysaccharide.** *J Immunol* 1986, **137**(8):2670-2675.
  61. Burton DR, Gregory L, Jefferis R: **Aspects of the Molecular-Structure of IgG Subclasses.** *Monographs in Allergy* 1986, **19**:7-35.
  62. Michaelsen TE, Garred P, Aase A: **Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration.** *Eur J Immunol* 1991, **21**(1):11-16.
  63. Garred P, Michaelsen TE, Aase A: **The Human-IgG Subclasses Reveal an Individual Character in Response to Shift in Antigen Concentration, Antibody-Affinity and Complement Concentration in Complement Mediated Cytolysis.** *Scandinavian Journal of Immunology* 1989, **30**(5):635-635.
  64. Valim YML, Lachmann PJ: **The Effect of Antibody Isotype and Antigenic Epitope Density on the Complement-Fixing Activity of Immune-Complexes - a Systematic Study Using Chimeric Anti-Nip Antibodies with Human Fc Regions.** *Clinical and Experimental Immunology* 1991, **84**(1):1-8.
  65. Hulett MD, Hogarth PM: **Molecular basis of Fc receptor function.** *Adv Immunol* 1994, **57**:1-127.
  66. Eskeland T, Klein E: **Isolation of 7S IgM and kappa chains from the surface membrane of tissue culture cells derived from a Burkitt lymphoma.** *J Immunol* 1971, **107**(5):1368-1375.
  67. Hsu E: **The variation in immunoglobulin heavy chain constant regions in evolution.** *Semin Immunol* 1994, **6**(6):383-391.
  68. Michaelsen TE, Ihle Ø, Beckstrøm KJ, Herstad TK, Kolberg J, Høiby EA, Aase A: **Construction and functional activities of chimeric mouse-human immunoglobulin g and immunoglobulin m antibodies against the Neisseria meningitidis PorA P1.7 and P1.16 epitopes.** *Infection and Immunity* 2003, **71**(10):5714-5723.
  69. Steward MW, Steensgaard J: **Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance.** Boca Raton, Florida: CRC Press; 1983.
  70. Anttila M, Eskola J, Ahman H, Kayhty H: **Avidity of IgG for Streptococcus pneumoniae type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines.** *Journal of Infectious Diseases* 1998, **177**(6):1614-1621.
  71. Goldblatt D, Vaz A, Miller E: **Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines following infant immunization.** *Journal of Infectious Diseases* 1998, **177**(4):1112-1115.
-

- 
72. Gupta R, R K|Rost,BE,B E|Relyveld,E,E|Siber,GR,G R: **Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds.** *Pharmaceutical biotechnology* 1995, **6**:229-248.
73. Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J: **In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production.** *European Journal of Immunology* 1996, **26**(9):2062-2066.
74. Gotschli EC, Liu TY, Artenste MS: **Human Immunity to Meningococcus .3. Preparation and Immunochemical Properties of Group a Group B and Group C Meningococcal Polysaccharides.** *Journal of Experimental Medicine* 1969, **129**(6):1349-&.
75. Griffiss JM, Brandt BL, Altieri PL, Pier GB, Berman SL: **Safety and Immunogenicity of Group-Y and Group W135 Meningococcal Capsular Polysaccharide Vaccines in Adults.** *Infection and Immunity* 1981, **34**(3):725-732.
76. Goldschneider I, Lepow ML, Gotschli EC, Mauck FT, Bachl F, Randolph M: **Immunogenicity of Group-a and Group-C Meningococcal Polysaccharides in Human Infants.** *Journal of Infectious Diseases* 1973, **128**(6):769-776.
77. MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Williams D, Pais L, Carlone G, Moxon R, Greenwood B: **Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambian children following repeated immunisation during early childhood.** *Vaccine* 1999, **17**(23-24):3086-3093.
78. Costantino P, Viti S, Podda A, Velmonte M, Nencioni L, Rappuoli R: **Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C.** *Vaccine* 1992, **10**(10):691-698.
79. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC, Fattom A, Yang Y, Lagergard T, Chu C, Sorensen US: **Prevention of Invasive Bacterial Diseases by Immunization with Polysaccharide-Protein Conjugates.** *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1989, **146**:169-180.
80. Wyle FA, Tramont EC, Lowenthal Jp, Berman SL, Brandt BL, Altieri PL, Artenste.Ms, Kasper DL: **Immunological Response of Man to Group B Meningococcal Polysaccharide Vaccines.** *Journal of Infectious Diseases* 1972, **126**(5):514-&.
81. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U: **An IgG Monoclonal-Antibody to Group-B Meningococci Cross-React with Developmentally Regulated Polysialic Acid Units of Glycoproteins in Neural and Extraneural Tissues.** *Journal of Immunology* 1987, **138**(12):4402-4407.
82. Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Holstfredriksen J, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nøkleby H, Rosenqvist E *et al*: **Effect of Outer-Membrane Vesicle Vaccine against Group-B Meningococcal Disease in Norway.** *Lancet* 1991, **338**(8775):1093-1096.
83. Saukkonen K, Abdillahi H, Poolman JT, Leinonen M: **Protective Efficacy of Monoclonal-Antibodies to Class-1 and Class-3 Outer-Membrane Proteins of Neisseria-Meningitidis B-15-P1.16 in Infant Rat Infection Model - New Prospects for Vaccine Development.** *Microbial Pathogenesis* 1987, **3**(4):261-267.
84. **Felleskatalogen over farmasøytiske spesialpreparater markedsført i Norge 2005;** 2005.
-

- 
85. Poolman JT, Hopman CTP, Zanen HC: **Immunogenicity of Meningococcal Antigens as Detected in Patient Sera.** *Infection and Immunity* 1983, **40**(1):398-406.
  86. Mæland JA, Wedege E: **Serum Antibodies to Cross-Reactive Neisseria Outer-Membrane Antigens in Healthy-Persons and Patients with Meningococcal Disease.** *Apmis* 1989, **97**(9):774-780.
  87. Andersen SR, Guthrie T, Guile GR, Kolberg J, Hou S, Hyland L, Wong SYC: **Cross-reactive polyclonal antibodies to the inner core of lipopolysaccharide from Neisseria meningitidis.** *Infection and Immunity* 2002, **70**(3):1293-1300.
  88. Vermont CL, van Dijken HH, van Limpt CJP, de Groot R, van Alphen L, van den Dobbelen G: **Antibody avidity and immunoglobulin G Isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine.** *Infection and Immunity* 2002, **70**(2):584-590.
  89. Holten E: **Serotypes of Neisseria-Meningitidis Isolated from Patients in Norway During the 1st 6 Months of 1978.** *Journal of Clinical Microbiology* 1979, **9**(2):186-188.
  90. Zollinger WD, Mandrell RE, Altieri P, Berman S, Lowenthal J, Artenstein MS: **Safety and Immunogenicity of a Neisseria-Meningitidis Type-2 Protein Vaccine in Animals and Humans.** *Journal of Infectious Diseases* 1978, **137**(6):728-739.
  91. Helting TB, Guthohrlein G, Blackkolb F, Ronneberger HJ: **Serotype Determinant Protein of Neisseria-Meningitidis - Large-Scale Preparation by Direct Detergent Treatment of the Bacterial-Cells.** *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica Section C-Immunology* 1981, **89**(2):69-78.
  92. Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Frøholm LO, Lindbak AK, Mogster B, Namork E, Rye U *et al*: **Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelse": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease.** *NIPH Ann* 1991, **14**(2):67-79; discussion 79-80.
  93. Zollinger WD, Boslego JW, Brandt B, Moran EE, Ray J: **Safety and Antigenicity Studies of a Polyvalent Meningococcal Protein-Polysaccharide Vaccine.** *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 1986, **52**(3):225-228.
  94. Rosenqvist E, Harthug S, Frøholm LO, Høiby EA, Bøvre K, Zollinger WD: **Antibody-Responses to Serogroup-B Meningococcal Outer-Membrane Antigens after Vaccination and Infection.** *Journal of Clinical Microbiology* 1988, **26**(8):1543-1548.
  95. Caugant DA, Høiby EA, Rosenqvist E, Frøholm LO, Selander RK: **Transmission of Neisseria-Meningitidis among Asymptomatic Military Recruits and Antibody Analysis.** *Epidemiology and Infection* 1992, **109**(2):241-253.
  96. Næss LM, Aarvak T, Aase A, Oftung F, Høiby EA, Sandin R, Michaelsen TE: **Human IgG subclass responses in relation to serum bactericidal and opsonic activities after immunization with three doses of the Norwegian serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccine.** *Vaccine* 1999, **17**(7-8):754-764.
  97. Hatefi Y, Hanstein WG: **Solubilization of Particulate Proteins and Nonelectrolytes by Chaotropic Agents.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1969, **62**(4):1129-&.
  98. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE: **Kromatografi**, 3. edn. Aurskog: Universitetsforlaget; 1998.
  99. Amersham Biosciences: **HiTrap Protein A HP, 1 ml and 5 ml.** In.; 2002.
-

- 
100. Millipore: **Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices**. In.; 2003.
  101. Aase A, Høiby EA, Michaelsen TE: **Opsonophagocytic and bactericidal activity mediated by purified IgG subclass antibodies after vaccination with the Norwegian group B meningococcal vaccine**. *Scandinavian Journal of Immunology* 1998, **47**(4):388-396.
  102. Spectrum® Laboratories Inc.: **Spectra/Por® 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 Molecularporous Regenerated Cellulose Dialysis Membran**. In.; 2001.
  103. Aase A, Bjune G, Høiby EA, Rosenqvist E, Pedersen AK, Michaelsen TE: **Comparison among Opsonic Activity, Antimeningococcal Immunoglobulin-G Response, and Serum Bactericidal Activity against Meningococci in Sera from Vaccinees after Immunization with a Serogroup-B Outer-Membrane Vesicle Vaccine**. *Infection and Immunity* 1995, **63**(9):3531-3536.
  104. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS: **Human Immunity to Meningococcus .I. Role of Humoral Antibodies**. *Journal of Experimental Medicine* 1969, **129**(6):1307-&.
  105. Halstensen A, Haneberg B, Froholm LO, Lehmann V, Frasch CE, Solberg CO: **Human Opsonins to Meningococci after Vaccination**. *Infection and Immunity* 1984, **46**(3):673-676.
  106. Talbot PJ, Buchmeier MJ: **Catabolism of Homologous Murine Monoclonal Hybridoma Igg Antibodies in Mice**. *Immunology* 1987, **60**(4):485-489.
  107. Vieira P, Rajewsky K: **The Half-Lives of Serum Immunoglobulins in Adult Mice**. *European Journal of Immunology* 1988, **18**(2):313-316.
  108. Næss LM, Rosenqvist E, Høiby EA, Michaelsen TE: **Quantitation of IgG subclass antibody responses after immunization with a group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine, using monoclonal mouse-human chimeric antibodies as standards**. *Journal of Immunological Methods* 1996, **196**(1):41-49.
  109. Mäkelä O: **Single Lymph Node Cells Producing Heteroclitic Bacteriophage Antibody**. *Journal of Immunology* 1965, **95**(2):378-&.
  110. Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS: **Antibody Avidity Determination by Elisa Using Thiocyanate Elution**. *Journal of Immunological Methods* 1986, **86**(1):83-87.
  111. Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM: **Determination of Parallelism and Nonparallelism in Bioassay Dilution Curves**. *Journal of Clinical Microbiology* 1994, **32**(10):2441-2447.
-

## **7 VEDLEGG**

<b>Vedlegg 1: Reagenser benyttet til analyser .....</b>	<b>A</b>
<b>Vedlegg 2: Program for ELISA-vasker (Scanwasher 300) .....</b>	<b>D</b>
<b>Vedlegg 3: Beregning av antistoffkonsentrasjon.....</b>	<b>E</b>



## Reagenser benyttet til analyser

### Kvantitering av total-IgG:

#### "Coatebuffer":

- PBS pH 7,4 1M/150 tilsatt natriumazid til 0,02 %  
*Begge komponenter fra substratlab, FHI*

#### Fortynningsbuffer for prøver og konjugat:

- PBS pH 7,4 1M/150 tilsatt natriumazid 0,02 % og tween 20 til 0,05 %  
*PBS og natriumazid fra substratlab, FHI*  
*Tween 20 fra Sigma*

#### Vaskeløsning:

- PBS pH 7,4 1M/150 tilsatt tween 20 til 0,05 %  
*PBS fra substratlab, FHI*  
*Tween 20 fra Sigma*

#### Konjugat:

- |   |        |
|---|--------|
| • Sekundært antistoff – sau 298#5, biotinylert 010799 fra FHI | 1:8000 |
| • Enzym – ALP P-5521, biotinylert 170105 fra FHI              | 1:4000 |
| • Streptavidin Z704A fra Promega                              | 1:6000 |

#### Substrat:

- |   |           |
|---|-----------|
| • NPP – fosfatesubstrat fra Sigma                     | 1 tablett |
| • Dietanolaminbuffer 10 % pH 9,8 fra substratlab, FHI | 5 mL      |

### Kvantitering av IgG1

#### "Coatebuffer":

- Samme som for total IgG

#### Fortynningsbuffer for prøver, spesifikt antistoff og konjugat:

- Samme som for total IgG

#### Vaskeløsning:

- Samme som for total IgG

#### Spesifikt antistoff:

- |  |        |
|--|--------|
| • HP 6069 Anti-IgG1 Fc, mIgG1 fra Centers for Disease Control, USA | 1:6000 |
|--|--------|

#### Konjugat:

- |   |        |
|---|--------|
| • Sekundært antistoff – S2099#6, biotinylert 120994 fra FHI | 1:4000 |
| • Enzym – ALP P-5521, biotinylert 170105 fra FHI            | 1:4000 |
| • Streptavidin Z704A fra Promega                            | 1:6000 |

#### Substrat:

- Samme som for total IgG

## Kvantitering av IgG3

### "Coatebuffer":

- Samme som for total IgG

### Fortynningsbuffer for prøver, spesifikt antistoff og konjugat:

- Samme som for total IgG

### Vaskeløsning:

- Samme som for total IgG

### Spesifikt antistoff:

- HP 6050 Anti-IgG3 hinge, mIgG1 fra Centers for Disease Control, USA 1:8000

### Konjugat:

- Samme som for IgG1

### Substrat:

- Samme som for total IgG

## Aviditet

### "Coatebuffer":

- Samme som for kvantitering av total IgG

### Fortynningsbuffer for prøver, spesifikt antistoff og konjugat:

- Samme som for kvantitering av total IgG

### Vaskeløsning:

- Samme som for total IgG

### Ammoniumthiocyanatløsning 4,0M

- $\text{NH}_4\text{SCN}$  fra Sigma 152,24g
  - PBS pH 7,4 1M/150 fra substratlab, FHI Ad 500 mL
- Denne stamløsningen ble deretter fortynnet med PBS til ønskede konsentrasjoner.  
0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 og 4.0

### Spesifikt antistoff for bestemmelse av aviditet for IgG1:

- Samme som for kvantitering av IgG1

### Spesifikt antistoff for bestemmelse av aviditet for IgG3:

- Samme som for kvantitering av IgG3

### Konjugat for bestemmelse av aviditet for IgG1 og IgG3:

- Samme som for kvantitering av IgG1 og IgG3

### Konjugat for bestemmelse av aviditet for total IgG

- Samme som for kvantitering av total IgG

### Substrat:

- Samme som for total IgG

## Protein A-kromatografi

### Milli Q Water

### PBS/azid

- PBS pH 7,4 1M/150 tilsatt natriumazid til 0,02 %  
*Begge komponenter fra substratlab, FHI*

### Citratfosfatbuffer pH 6.0

- 0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  250 mL
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  71,2 g
  - Milli Q Water Ad 1 L
- 0,2 M sitronsyre 150 mL
  - Citronsyre 42,03 g
  - Milli Q Water Ad 1 L

### NaAcetat pH 5.0

- 0,2M Natriumacetat pH 4.0 *fra substratlab, FHI*
- Konsentrert NaOH Justert til pH 5.0

### NaAcetat pH 4.5

- 0,2M Natriumacetat pH 4.0 *fra substratlab, FHI*
- Konsentrert NaOH Justert til pH 4.5

### NaAcetat pH 4.0

- 0,2M Natriumacetat pH 4.0 *fra substratlab, FHI*

## Gelfiltrering

### Tris/HCl buffer m/EDTA

- Tris/HCl buffer *fra substratlab, FHI*
- 0,2 M NaCl *fra substratlab, FHI*
- 2 mM Natriumedetat *fra substratlab, FHI*

## Ionebytterkromatografi

### 0,015 M K/Na fosfatbuffer pH 7,6

*Fra substratlab, FHI*

## **Program for ELISA-vasker (Scanwasher 300)**

### ***Instrument levert av Skatron***

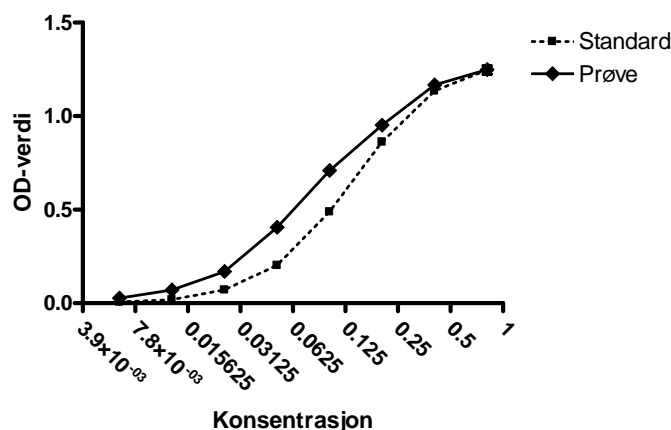
5x vask med 2x skylling:

- # 1 Aspirering av prøve
- # 2 Dispensering av vaskeløsning – 250 µl
- # 3 Aspirering av vaskeløsning
- # 4 Dispensering av vaskeløsning – 250 µl
- # 5 Skylling med vaskeløsning i 5 sekunder
- # 6 Aspirering av vaskeløsning
- # 7 Dispensering av vaskeløsning – 250 µl
- # 8 Aspirering av vaskeløsning
- # 9 Dispensering av vaskeløsning – 250 µl
- # 10 Skylling med vaskeløsning i 5 sekunder
- # 11 Aspirering av vaskeløsning
- # 12 Dispensering av vaskeløsning – 250 µl
- # 13 Aspirering av vaskeløsning
- # 14 Vaskeprogram slutt

## Beregning av antistoffkonsentrasjon

Standard konsentrasjon	Standard Absorbans		Prøve Absorbans		Beregnet Konsentrasjon
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 1	Parallell 2	
0,812500	1,270	1,224	1,261	1,238	1,7
0,406250	1,144	1,126	1,180	1,154	1,9
0,203125	0,878	0,845	0,962	0,941	2,0
0,1015625	0,499	0,478	0,703	0,716	2,4
0,05078125	0,205	0,199	0,403	0,408	2,8
0,02539063	0,071	0,069	0,162	0,176	2,9
0,01269531	0,019	0,017	0,064	0,077	3,3
0,006347656	0,003	0,008	0,033	0,021	3,8

Grafisk fremstilling av OD-verdi



Tabellen over viser avleste Absorbanser for standard og ukjent prøve fra Softmax. Standardens konsentrasjon er angitt i første kolonne i  $\mu\text{g/mL}$  og beregnet konsentrasjon ut i fra Absorbans sammenlignet med standardens Absorbans og fortynningsfaktor er vist i siste kolonne. Diagrammet viser grafisk fremstilling av resultatene med standardkurve og kurve for ukjent prøve. Diagrammet er fremstilt ved hjelp av Graph Pad Prism 4.0.

Minst to av punktene for beregnet konsentrasjon av ukjent prøve ble benyttet for å bestemme konsentrasjonen. Disse punktene ble valgt fra et område der kurven for ukjent prøve og standardkurven var parallelle. En variasjonskoeffisient  $< 20\%$  mellom ulike fortynninger ble brukt som et mål på at kurvene var parallelle [111].

Av diagrammet ser det ut til at graden av parallellitet er størst rundt punkt 4, 5 og 6 talt fra høyeste konsentrasjon. Beregnet konsentrasjon for disse punktene varierer også  $< 20\%$  og blir derfor benyttet for å bestemme konsentrasjon i den ukjente prøven. Konsentrasjon settes til gjennomsnittet av de 3 punktene.